

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2000-512131

(P2000-512131A)

(43) 公表日 平成12年9月19日 (2000.9.19)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A
A 6 1 P 25/28		A 6 1 K 31/00	6 2 6 N
25/18			6 2 6 G
35/00			6 3 5
37/00			6 3 7

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 62 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平9-541946
 (86) (22) 出願日 平成9年5月29日 (1997.5.29)
 (85) 翻訳文提出日 平成10年11月30日 (1998.11.30)
 (86) 国際出願番号 P C T / I B 9 7 / 0 0 8 2 7
 (87) 国際公開番号 W O 9 7 / 4 5 7 4 6
 (87) 国際公開日 平成9年12月4日 (1997.12.4)
 (31) 優先権主張番号 6 0 / 0 1 8 , 3 8 0
 (32) 優先日 平成8年5月29日 (1996.5.29)
 (33) 優先権主張国 米国 (U S)
 (81) 指定国 E P (A T, B E, C H, D E, D K, E S, F I, F R, G B, G R, I E, I T, L U, M C, N L, P T, S E), A U, B R, C A, C N, J P, M X, N Z, R U

(71) 出願人 マクギル ユニバーシティ
 カナダ ケベック州 モントリオール ユ
 ニバーシティーストリート 3550 オフィ
 ス オブ テクノロジー トランスファー
 (72) 発明者 キャッシュマン ネイル アール
 カナダ ケベック州 モントリオール ド
 レイパー アベニュー 3859
 (72) 発明者 ドデレット ヴィンセント
 カナダ ケベック州 モントリオール ク
 ラーク ストリート 4826
 (74) 代理人 弁理士 吉田 研二 (外2名)

(54) 【発明の名称】 プリオン蛋白結合蛋白およびその使用法

(57) 【要約】

本発明は、プリオン蛋白結合蛋白 (P r P B P s) 及び
 それを用いた診断、治療及び除去方法の特徴とする。本
 発明は P r P B P の単離のための融合蛋白試薬を特徴と
 する。

【特許請求の範囲】

1. プリオン蛋白の存在に関連した疾病の治療に使用し得る治療物質を同定する方法であって、

a) テスト物質の存在下で選択されたプリオン結合蛋白の $P_r P^{Sc}$ 又は $P_r P^C$ に対する結合量を測定し、

b) 前記テスト物質の非存在下で選択されたプリオン結合蛋白の前記 $P_r P^{Sc}$ 又は前記 $P_r P^C$ に対する結合量を測定し、

ここで、テスト物質の存在下で選択されたプリオン結合蛋白の $P_r P^{Sc}$ 又は $P_r P^C$ に対する結合量が、前記テスト化合物の非存在下で選択されたプリオン結合蛋白の前記 $P_r P^{Sc}$ 又は前記 $P_r P^C$ に対する結合量よりも低いときに、前記テスト化合物が、プリオン蛋白の存在に関連した疾病の治療に使用し得る治療物質であることが示される方法。

2. 前記選択されたプリオン結合蛋白がカドヘリンであることを特徴とする請求の範囲1に記載の方法。

3. 前記カドヘリンがプロトカドヘリン43であることを特徴とする請求の範囲2に記載の方法。

4. 前記カドヘリンがOB-カドヘリン-1であることを特徴とする請求の範囲2に記載の方法。

5. 前記選択されたプリオン結合蛋白が配列番号2の配列を有することを特徴とする請求の範囲1に記載の方法。

6. プリオン結合蛋白をコードする核酸分子を同定する方法であって、

a) 哺乳動物cDNA分子の集合物を形質導入したカエルの卵母細胞の個体群を準備し、

b) 検出可能に標識された $P_r P$ に前記カエルの卵母細胞の個体群を接触させ、

c) 検出可能に標識された $P_r P$ に結合したカエルの卵母細胞を選択し、

d) 前記c工程において選択された卵母細胞内に存在するcDNAと同一のcDNA分子が形質導入されたカエルの卵母細胞の第二の個体群を調整し、

e) 検出可能に標識されたPrPにカエルの卵母細胞の前記第二の個体群を接触させ、

f) 前記第二の個体群中で検出可能に標識されたPrPに結合するカエルの卵母細胞を同定し、

g) 前記f工程で同定されたカエルの卵母細胞を形質導入するために使用したcDNAと同一のcDNA分子を取得する、ことを含む方法。

7. PrPと、全ての又は一つのアルカリフォスファターゼ蛋白とを含む融合蛋白。

8. 生物学的サンプルからPrP^{Sc}を回収する方法であって、

a) PrP^{Sc}とPrP結合蛋白との間で複合体が形成可能な条件において、前記生物学的サンプルを請求の範囲1のPrPB₂と接触させ、

b) 生物学的サンプルからPrP^{Sc}-PrP結合蛋白複合体を回収する、ことを含む方法。

9. プリオン蛋白の存在に関連した疾病を治療する方法であって、

前記方法が、カドヘリン全体又はカドヘリンのPrP結合部分を投与することを含む方法。

10. 前記カドヘリンがプロトカドヘリン43であることを特徴とする請求の範囲9に記載の方法。

11. 前記カドヘリンがOB-カドヘリン-1であることを特徴とする請求の範囲9に記載の方法。

12. 前記選択されたプリオン結合蛋白が配列番号2の配列を有することを特徴とする請求の範囲10に記載の方法。

13. 選択されたカドヘリンとPrP^Cと間の望ましくないレベルの相互作用に関連する疾病の治療に使用し得る治療用物質を同定する方法であって、

a) テスト化合物存在下で、前記選択されたカドヘリンのPrP^Cに対する結合量を測定し、

b) 前記テスト化合物非存在下で、前記選択されたカドヘリンのPrP^Cに対する結合量を測定し、

前記テスト化合物存在下で前記選択されたカドヘリンの $P_r P^c$ に対する結合量が低下している場合に、前記テスト化合物が前記選択されたカドヘリンと $P_r P^c$ と間の望ましくないレベルの相互作用に関連する疾病の治療に使用し得る治療用物質であることを示す方法。

14. カドヘリンと $P_r P^c$ と間の望ましくないレベルの相互作用に関連する疾病の治療方法であって、

カドヘリン全体又はカドヘリンの $P_r P^c$ 結合部分を投与することを含む方法。

15. 疾病は癌であることを特徴とする請求の範囲14に記載の方法。

16. 疾病は神経変性疾患であることを特徴とする請求の範囲15に記載の方法。

17. 疾病は免疫学的疾患であることを特徴とする請求の範囲15に記載の方法。

18. 前記カドヘリンがプロトカドヘリン43であることを特徴とする請求の範囲15に記載の方法。

19. カドヘリンがOB-カドヘリン-1であることを特徴とする請求の範囲1

5に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

プリオン蛋白結合蛋白およびその使用法発明の背景

本発明は、プリオン蛋白結合蛋白、核酸、およびその使用法に関する。

プリオン疾患は、急性進行性で致死かつ治療不能な神経変性症候群である。ヒトのプリオン疾患には、偶然汚染された非経口治療物質（死体から抽出される下垂体ホルモン等）および移植された組織（角膜や硬膜移植片等）を介して伝染されうるクロイツフェルトーヤコブ病（CJD）がある。現在までに、カナダ赤十字は、後にCJDを発病したドナーや、家族にCJD患者のいるドナーによる汚染の危険性があるとして、1200万ドルを越える血液製剤をカナダ市場から回収している。また北米では、英国のウシ海綿状脳症と同じく、ヒツジおよびヤギのスクレイピーが一般的かつ経済的に重要なプリオン関連疾患である。ウシ海綿状脳症はまた、人間の牛肉消費およびこれらの種からの生物学的産品の調製に対して、健康および経済の面で大きな意味をもつ。

プリオン疾患の病理学的特徴は、海綿状の変化（つまり通常は灰白質において主に発生する脳の微細空洞化）、ニューロン細胞の損失、ニューロン細胞の損失とは比例しない星状細胞の増殖、および時には脳の個別ブランク中の異常アミロイド形成蛋白の蓄積である。プリオン疾患における神経変性は、アルツハイマー症、筋萎縮側索硬化症、およびパーキンソン症等の他のより一般的な神経変性症候群と同じある基本的メカニズムをもつ可能性がある。

これらの疾患を伝染させる物質は、感染物質中で核酸成分の化学的または物理的証拠が複製可能に検出されていないため、ウイルスおよびウイロイドとは大きく異なる（Prusiner, Science 216:136-144, 1982）。プロテイナーゼK消化を利用したスクレイピー物質の精製方法により、スクレイピーに冒されたハムスターの脳中にPrP²⁷⁻³⁰と呼ばれる27-30kD耐プロテアーゼ蛋白が発見された（Bolton et al., Science 218:1309-1311, 1982）。PrP²⁷⁻³⁰はスクレイピー物質の活性とともに精製され、その後、伝達可能物質の主たる

（または唯一の）高分子であることが示された（McKinley et al., Cell 35:57-

62, 1983)。PrP²⁷⁻³⁰は後に、やはり疾患を伝染しうるスクレイピー物質蛋白(PrP^{Sc}と呼ばれる)の33-37 kD完全形の蛋白分解消化産生物であると判断された。

PrP²⁷⁻³⁰のアミノ酸配列の一部を決定し、cDNAをクローニングすると、この蛋白をコードする遺伝子は宿主に由来することがわかった(Oesch et al., Cell 40:735-746, 1985)。この細胞蛋白は正常な脳から単離され、PrP^{Sc}と異なりプロテアーゼに感受性であり、スクレイピー疾患を発生する活性とは無関係である(Bendheim et al., Ciba Found. Symp. 164-177, 1988)。感染粒子関連のPrP^{Sc}は、正常細胞の前駆体PrP^Cに由来すると仮定される(Prusiner, Science 252:1515-1522, 1991)。近年、PrP^CからPrP^{Sc}への無細胞PrP^{Sc}を触媒とした転化が報告されている(Kocisko et al., Nature 370:471-473, 1994)。プロテアーゼ感応性の正常細胞アイソフォームであるPrP^Cは、進化過程で保存されてきた未知の機能をもつ膜蛋白である。近年、グリコシルホスファチジルイノシトール(GPI)結合された蛋白であるPrP^Cが、コンカナナリンA刺激(stimulation)によってT細胞の活性化を修飾することが示されており(Cashman et al., Cell 61:185-182, 1990)、この蛋白の重要な機能上の役割を示唆している。

種と種との間のプリオン疾患の伝染は、主にPrPアミノ酸配列によって決定される「種のバリア」によって制限される。さらに、最近の形質転換(トランスジェニック)実験でも、やはりプリオン物質の形成に参画する、PrPとは異なる種特異的な高分子の役割を示唆している。プリオン疾患をもつヒトの脳抽出物を接種した、高レベルのヒトキメラPrP^Cを発現しているトランスジェニックマウスは、ヒトプリオンに耐性があった。ヒトプリオンに感染するのは、マウスのPrP遺伝子を切除した場合、またはヒト-マウスキメラプリオン遺伝子が発現した場合のみであった。これらの発見は、ヒトよりもマウスプリオン蛋白に対する親和性が高い種特異的な結合蛋白が存在する可能性を示唆している(Telling et al., Cell 83:79-90, 1995)。

現在のところ、感度の高い診断テストは市場にでておらず、またヒトプリオン

疾患の治療法もない。

発明の概要

本発明は、全般的には実質的に純粋なプリオン蛋白結合蛋白 (PrPBPs) に関する。これら蛋白は、飽和可能なもしくは置換可能な形式でプリオン蛋白 (PrP) に結合するという特徴を有している。好ましくは、この結合は高い親和性を有し、その結果、適切な機能的な兆候を生じさせる。この適切な機能的兆候の例としては、細胞増殖の阻止又は細胞死のレベルの上昇などである。以下に、二つのPrPBPsについて述べる。これら蛋白はマウス細胞から単離されたものであり、細胞表面蛋白である。これらPrPBPsをコードする遺伝子のクローニング及び特徴決定について本明細書において述べる。他の好ましいPrPBPsは、哺乳動物、特にヒトや家畜又はペットなどの種類に由来することが好ましいように思われるが、これに限られず、いかなる生物から由来する細胞又は組織サンプルより単離されたものでもよい。

また本発明は、PrPBPsをコードする精製された核酸、ベクター、及びこれら核酸を含む細胞、PrPBPsに対して特異的に結合する抗体及び組換えPrPBPsを生産する方法をも含む。この方法は、PrPBPsをコードするDNAを用いて細胞を形質転換して細胞内で発現するような位置に組み込み、そして、形質転換した細胞をDNAが発現可能な条件下で培養し、最終的に組換えPrPBPsを回収する。

これらPrPBPsはプリオン関連疾患と同様に非プリオン関連疾患の治療、検出にも有用である。この非プリオン関連疾患は、例えば、例えば筋ジストロフィや異常な細胞増殖または異常な細胞死に関連した疾患で見られるような種々の変異性症候群などである。これらPrPBPsはプリオンを含むことが明らかな場合又は予想されるサンプルからプリオンを取り除くためにも役立つ。

本発明の他の側面としては、PrP部分とアルカリフォスファターゼ部分とを含む融合蛋白質を包含している。好ましくは、この蛋白はPrPドメインの内、結合活性と機能活性とをそのまま維持している。これらPrP-AP融合蛋白は、細胞、組織、体液、他の生物学的サンプル中のPrPBPs又はPrP^{Sc}などの

ラベリング、検出又は同定のための有用な親和性試薬となり得る。

さらに、PrP-AP融合蛋白は細胞サンプル中のPrPB蛋白の同定及びアフィニティ精製を行う際にも、また、PrPB蛋白をコードする配列のクローニングにも有効である。本発明に従った一つの特定的方法としては、細胞表面にPrPBsの発現が最も少ないというバックグラウンドを有するカエルの卵母細胞を用いた方法である。この方法は、前記卵母細胞に、PrP-AP融合蛋白に関連するcDNAライブラリの集合又は単離クローン由来のインビトロで転写されたmRNAを注入する。そして、PrP-APが結合し得る蛋白を発現している細胞を同定し、これによってPrPBをコードするcDNAクローンの大まかな同定が可能となる。最終的にこれら細胞からcDNAを精製して、PrPBをコードする配列が回収されることになる。

また、本発明に関連する側面としては、生物学的サンプル中のPrP^{Sc}を検出する方法及びキットに関する。好ましい形態としては、この方法は次の工程から構成される。すなわち、(a) 生物学的なサンプル中のPrP^Cを破壊する（この破壊する方法としては、例えば蛋白溶解性の変性を用いることができる）。次に(b) この生物学的サンプルをPrPBと接触させる。そして最終的に(c) 生物学的サンプル中におけるPrPBとPrP^{Sc}との間で形成される複合体を検出する。この複合体形成の検出は生物学的サンプル中にPrP^{Sc}が存在していることを示す。この検出解析に使用されるPrPBは、融合蛋白（例えばPrPB-AP）、又はPrP^{Sc}と結合し得るPrPBフラグメント又はそのアナログである。好ましい形態においては、複合体形成は直接標識されたPrPB（又はそのフラグメント、又はそのアナログ）を用いることによって検出される。他の好ましい形態としては、複合体形成は、例えばPrPB（又はフラグメント、又はそのアナログ）に対する抗体を用いることによって間接的に検出される。さらに他の好ましい形態としては、PrP^{Sc}の検出はPrPB:PrP^{Sc}複合体中における標識されたPrP^{Sc}が生物学的サンプル中に存在する非標識PrP^{Sc}に置換される量を測定することによって検出される。

本発明のもう一つの関連する側面としては、生物学的サンプルからPrP^{Sc}を取り除くための方法及びキットに関する。好ましい形態としては、この方法は次

の工程から構成される。(a) PrPBP (又はそのフラグメント、又はそのアナログ) 又はPrPBP融合蛋白と生物学的サンプルを十分な時間処理する。そして、この処理により、PrPBP:PrP^{Sc}複合体を形成させる。(b) 生物学的サンプルからPrPBP:PrP^{Sc}複合体を回収する。こうした除去方法においては、生物学的サンプル (例えば、移植用に調整された細胞又は臓器など) にPrPBP (又はフラグメント又はそのアナログ) を混合して、PrP^{Sc}を回収し又はPrP^{Sc}を不活性化をする。

他の形態としては、PrPBP (又はフラグメント又はそのアナログ) に結合したPrP^{Sc}は抗PrP抗体によって検出してもよい。

PrP^{Sc}に結合するPrPBPsは、診断又は他の解析においてPrP^{Sc}の定量を行う際に用いることもできる。

仮に、得られたPrPBPがPrP^{Sc}に対して結合せず、その代わりにPrP^Cにのみ結合する場合には、そのようなPrPBPは、PrP^{Sc}とPrP^Cとの双方を含むサンプルからPrP^Cを取り除くために用いることができる。その後、PrP^{Sc}、PrP^C双方に結合し得る抗体を用いれば、サンプル中に残存するPrP^{Sc}を検出することができる。

本発明のさらにもう一つの関連する側面としては、動物 (例えば、ヒト) におけるプリオン疾患の治療又は予防方法に関する。好ましい形態としては、この方法はPrPBP:PrP^{Sc}複合体形成を拮抗する物質、PrP^CからPrP^{Sc}への転換を阻止する物質、又はPrPBP-PrP^{Sc}複合体に起因した生物学的活性を抑制する物質を治療に効果的な量において動物に投与することを含む。さらに好ましいもう一つの形態は、この方法はPrP^CからPrP^{Sc}への転換を拮抗する物質を治療に効果的な量において動物に投与する方法を含む。

もう一つの治療アプローチとしては、本発明は、動物におけるPrPBP:PrP^{Sc}複合体に起因した生物学的活性を抑制する方法が含まれる。好ましい形態としては、この方法は、物質 (例えば、PrPBPに対する抗体、PrPBP、又はこれらのフラグメント又はそのアナログ) を動物に投与してPrPBP:PrP^{Sc}複合体相互作用を阻害することが含まれる。さらに、PrPBPsを用いた処置は、生体内における細胞毒性を有するシグナルの発生を阻止してPrP^C

とPrP^{Sc}との相互作用を防止する。

本発明のもう一つの側面は、PrPB P（又はフラグメント又はそのアナログ）とPrPとの結合相互作用を低下させるための物質を同定する方法に関する。好ましい形態としては、本発明は次の工程から構成される。すなわち、（a）PrPB PとPrPとを試験物質と混合する。（b）試験物質の存在下におけるPrPB PのPrPに対する結合量を測定する。そして（c）コントロールサンプルと比較して、試験物質がPrPB PのPrPに対する結合能を低下させるかどうかを同定する。

もう一つの治療的なアプローチでは、本発明は機能的に活性化されたPrPB Pを抑制することにより神経変性症候群を治療する方法に関する。好ましい形態としては、この方法は、物質、例えば小さな分子のアンタゴニスト又はアゴニスト、PrPB P由来の細胞内シグナルの生成を阻止又は促進するペプチド又は疑似ペプチドを動物に注入する。

特定の疾患、例えば神経変性疾患、ガン及び免疫学的疾患は、PrPB Pの一つであるカドヘリンとPrP^Cとの相互作用を増大又は減少させる分子を投与することによって治療され得る。例えば、カドヘリン全体又はカドヘリンのPrP結合部位は内在のカドヘリンとPrP^Cとの相互作用を阻害するために用いることができる。

さらに、神経変性疾患、ガン及び免疫学的疾患の治療に有用な物質は、選択された試験物質がカドヘリンとPrP^Cとの間の結合を増大又は減少させるかどうかを決定することによって同定され得る。

上記において「プリオン蛋白結合蛋白」すなわち「PrPB P」には、「プリオン蛋白」すなわち「PrP」と飽和可能な又は置換可能な形式で結合し得るいかなる蛋白をも含まれる。好ましくは、この結合は、通常の生理学的条件下において「高親和性」であり、形態依存的である。本発明によるPrPB Pは、通常の細胞の存在状態において、少なくとも一時の間、細胞表面上に発現されていることが望ましく、また、宿主細胞の細胞質、細胞質のオルガネラ又は核において常に又は一時的に自然の状態が発現されているものであってもよい。PrPB

P s は特定の細胞、組織又は生物において、その蛋白のファミリーとして存在しているものであってもよい。P r P B P s はいかなる生物（特にヒトのような哺乳動物、又は家畜、例えばヒツジ、ウシ、ネコ及びヤギ）由来のものも本発明に包含される。

ここで「高親和性」の結合とは、親和性定数（プリオン蛋白とP r P B P との親和性定数）が $100\mu\text{M}$ 以下、 $10\mu\text{M}$ 以下、 $1\mu\text{M}$ 以下、 100nM 以下、好ましくは 10nM 以下、さらに好ましくは 2nM 以下又はちょうど 1nM であることを意味する。

ここで「飽和可能な」結合とは、結合（プリオン蛋白とP r P B P との結合）が特定の最大値に達した後はその増加が停止するような結合を意味する。こうした結合は、一蛋白あたりの結合部位の数が限られ、また結合部位が特異的であることを示す。これは、細胞表面に非特異的に付着する蛋白の特性、例えば非特異的及び結合の増加が止まることがないという特性とは相反する結合である。

ここで「形態依存的結合」とは、通常の生理学的結合特性をそのまま残している蛋白のように翻訳後に正しく修飾され、折りたたまれ（ホールディングされ）、輸送が行われている非変性蛋白において生じる結合を意味する。

ここで「拮抗的な（競合的な）」結合とは、競合する蛋白群の一つ（例えば、P r P）が非標識の場合に、この非標識の蛋白の濃度が増加することにより進行的に阻害されるような結合（プリオン蛋白とP r P B P の結合）を意味する。

また、「プリオン疾患」とは、急性進行性、致死的な及び治療不可能な脳変性疾患群を意味し、これらには、例えばクロイツフェルトーヤコブ病（C J D）、クールー、ゲルストマンーストラウスラー症候群及びヒトの致死的な家系性不眠症（Prusiner, Science 252:1515-1522, 1991）、ヒツジ及びヤギのスクレイピー、及び畜牛における海綿状の脳障害、同様に近年報告されている他の反芻動物や猫におけるプリオン疾患などが含まれるが、これらのものに限定されない。

「プリオン疾患の治療」とは、プリオン疾患に伴う症状の発生を減少、予防又は遅延させることを意味する。このプリオン疾患に関連する疾患としては特に、

最終的に海綿状への変性、神経細胞の消失、星状細胞の増殖、PrP^{Sc}蛋白の増殖及び痴呆、及び死に至らしめる種々の疾患が含まれる。

「実質的に純粋」とは、目的の物質が重量（乾燥重量）として少なくとも60パーセントとなるように調整されていることを意味する。好ましくは、この調整品は少なくとも75パーセント、さらに好ましくは少なくとも90パーセント、最も好ましくは少なくとも99パーセントの重量パーセントとして目的物質が含まれている。この純度は、いかなる適切な方法、例えばポリアクリルアミド・ゲル電気泳動法又はHPLC解析によって測定することもできる。

「精製されたDNA」とは、コーディング配列が、生物内の天然に存在するゲノムでは両端に（5'末端及び3'末端に）隣接している配列を直接隣接していないことを意味する。従って、この「精製されたDNA」には、例えば、組換えDNA）すなわちベクターに導入されたもの、自己複製可能なプラスミド又はウイルスに導入されたもの、原核生物又は真核生物のゲノムDNA内に導入されたDNAも含まれる。さらに、このDNAには、他の配列とは独立して単離された分子（例えば、PCR又は制限酵素処理によって生成されたcDNA又はゲノムDNA）も含まれる。また、この「精製されたDNA」には、ポリペプチド配列をコードする遺伝子の融合遺伝子の一部に含まれている組換えDNAが含まれる。

「形質転換された細胞」とは、（ここで用いているものの例として）PrPB PをコードするDNA分子が組換えDNA技術によって導入された細胞（又は、前記DNA分子がその祖先の細胞に導入された場合の子孫の細胞）を意味する。

「発現のために配置させる」とは、DNA配列の転写、翻訳を誘導するDNA配列の近傍にDNA分子を配置させることを意味する（これにより、例えばPrPB Pの産生を可能にさせる）。

「精製された抗体」とは、少なくとも重量として60パーセントの純度において、天然に関連している他の蛋白や自然に発生する有機分子から精製された抗体を意味する。好ましくは、この調整品は少なくとも75パーセント、さらに好ましくは少なくとも90パーセント、さらに最も好ましくは少なくとも99パーセ

ントの重量パーセントである。この抗体は、例えばPrPB P特異的抗体である。精製されたPrPB P抗体は、例えば組換え技術によって生成されたPrPB Pを用いたアフィニティ・クロマトグラフィや、スタンダードな技術を用いて得ることができる。

「特異的な結合」とは、抗体が、天然の状態でPrPB Pを含むサンプル、例えば、生物学的サンプル中のPrPB Pを認識し結合するが、他の物質は実質的に認識せず又結合しないことを意味する。

「アルカリフォスファターゼ」とは、検出可能なシグナルを発生させ得る活性を有するアルカリフォスファターゼ蛋白の画分のすべてを意味する。

上述したように本願発明は、プリオン疾患の診断及び治療のための二つの非常に重要な効果をもたらす。第一に、本願発明はPrPB P sを同定及び単離する際に用いることができるPrP融合蛋白を提供し、これにより、これらPrPB P sをコードする遺伝子又はcDNAをクローン可能とすることがである。特に、一つの好ましいPrP融合蛋白は、アルカリフォスファターゼと融合させて作られる。このPrP-A P蛋白は種々の効果を有する。例えば、PrP-A P蛋白は、PrPの通常の形態に最小限の影響しか与えないため、PrPのPrPB P sに対する結合（及び、特に、高親和性結合）を維持できるという利点を有する。また、このPrP-A P融合蛋白は、通常の細胞内のPrP機能を引き起こさせる活性を維持している。この点は、従来のPrP発現構築体に比べて非常に有利な点である。おそらく最も重要な点としては、このPrP-A P融合蛋白は、PrPB P sと特異的に結合可能であり、またに高親和性を有している。従って、この融合蛋白は、組織源からPrPB P sを取得又は単離する有用な親和性試薬となり得る。また、これは新たなPrPB P sを同定する手段を提供するものとなり、また、これら蛋白（例えば、ゲル上の新たな蛋白バンドとして存在する蛋白）の迅速な精製を可能にする。ここで精製された蛋白は、cDNAのクローニングやゲノムの配列のような蛋白のミクロ的な配列決定のために用いることができる。一つの特定の技術としては、PrP-A P融合蛋白は、新たなPrPB P sの同定及びクローニングに用いることができる。この同定としては、cD

NAライブラリ由来のインビトロで転写させたmRNAを用いてマイクロインジェクションを行ったカエルの卵母細胞をスクリーニングし、融合蛋白と特異的に結合するクローンを選択する。このPrPBpによるスクリーニングの方法は、次の点で有利である。通常では細胞内の発現レベルが非常に低く又は通常ではPrP-AP結合に利用し得ないPrPBpsの同定が可能になる。さらに、PrP-

AP融合蛋白は測定が容易な酵素であるアルカリフォスファターゼを含んでいることから、実験又は治療、診断条件においてPrPBpsの定量化又は視覚化を行う道具として役立つ。

本発明のもう一つの重要な側面としては、プリオン蛋白と飽和可能な又は置換可能な形式で結合するプリオン蛋白融合を提供する。これらPrPBpsは種々の利点を有している。第一に、これら蛋白はPrPsと特異的に結合することから、これらを検出可能なマーカーで標識することにより、細胞、組織、又は生物学的液体中のPrP^{Sc}の存在を分析する簡便な手段を提供し得る。また、標識された場合には、これら蛋白は、PrPに結合する他の薬学的物質の同定を行うための薬剤（ドラッグ）スクリーニング・プロトコル（例えば、拮抗的（競合的）結合解析）において用いることができる。このようなPrP^{Sc}に対する特異的な又は飽和可能な結合親和性を有していることから、PrPBpsは感染した細胞、組織又は生物学的液体を二次的な分離技術を通してPrP^{Sc}を回収するか、又は体内におけるPrP^{Sc}活性の回復を中和することによって、治療するためのよい候補となる物質を提供する。PrPBpsは、プリオン疾患に苦しめられている患者の治療に使用し得るという点においても、また利点を有している。例えば、PrPBps、ペプチド・フラグメント又はそのアナログを体内に注入することにより、これらがプリオン蛋白群のいずれかと結合することによって、PrP^cからPrP^{Sc}への転換を抑制することに使用し得る。

本発明の他の特徴及び効果は詳細な説明からさらに明らかになり、またクレームにおいて明らかとされる。

図1Aは、ネズミのPrP-AP融合蛋白発現ベクターの概略図である。

図1Bは、分泌されたアルカリフォスファターゼを発現する対照プラスミドの概略図である。

図2は、PrP-AP融合蛋白がPrP^cおよびAP双方の免疫学上の決定基を含むことを示す放射能写真である。APを発現するCMV/SEAPベクター（レーン1および2）またはPrP-APを発現するAPtagベクター（レーン3および4）でトランスフェクトされた、³⁵[S]-メチオニン標識されたCOS細胞の上清を、成熟蛋白のN末端の17のアミノ酸に対する抗APモノクローナル抗体（レーン1および3）またはPrPウサギポリクローナル抗体を用いて免疫沈降を行った。各免疫沈降反応には等価AP活性を加えた。

図3は、PrP-APが、PrP^cドメインを介して選択細胞系に特異的に付着することを示す棒グラフである。これらの異なるマウス細胞系を60mmプレート（約100,000個の細胞）中で融合するまで培養し、3mlのCOS細胞の検査上清を加えて室温で90分間インキュベートし、洗浄、溶解を行い、アルカリフォスファターゼの活性を判定した。結果は次の通りである。対照：疑似トランスフェクトされたCOS細胞由来の調整済み媒体で、検出可能なアルカリフォスファターゼ活性を含まなかった。SEAP：CMV/SEAP構築体でトランスフェクトされたCOS細胞由来の上清で、対照と比べて表面結合をまったく示さなかった。PrP-AP：PrP-AP構築体でトランスフェクトされたCOS細胞由来の上清で、表面結合を示した。SEAPおよびPrP-AP上清は同じアルカリフォスファターゼ活性（1時間あたり約5000D単位）を含んでいた。

図4は、APではなくPrP-APが「間接免疫蛍光」プロトコルによって細胞表面分子を認識する様子を示す2枚の写真パネルである。G8細胞（マウスの筋細胞系）をプロテアーゼを用いずに機械的に解離させ、PrP-AP蛋白またはAP蛋白でインキュベートし、洗浄し、抗APモノクローナル抗体でインキュベートし、洗浄し、フルオレセインイソチオシアネートでタグされたヤギの抗マウス免疫グロブリンでインキュベートし、洗浄し、蛍光顕微鏡で検査した。Pr

P-A Pでインキュベートした細胞（左側のパネル）の蛍光信号は、A Pでインキュベートした細胞（右側のパネル）と比較すると、P r P-A P融合蛋白のP r Pドメインに起因する特定の細胞表面結合を示す。

図5は、P r P-A P結合がそのP r P^cドメインを介して競合かつ置換可能であることを示すグラフである。35 mmプレート中のNIH 3T3細胞を、上記と同じく、代謝的に³⁵[S]-メチオニン標識されたP r P-A P構築体でトランスフェクトされたCOS細胞から得られた上清でインキュベートした。そ

の後、細胞を洗浄し、溶解し、結合された放射能をβ計数法で定量した。³⁵[S]-P r P-A Pの結合は、いわゆる「コールド（放射能活性のない）」未標識P r P-A Pの濃度増加によって進行的に競合されるが、同じ濃度をもつCMV/SEAPトランスフェクトされたCOS細胞由来のA Pでは競合されない。

図6は、P r P-A Pに接触させたG8筋細胞系培養物中の細胞数の減少を示す2枚の写真パネルである。複数の24ウェルプレート (well plates) 中の姉妹G8培養細胞を、A Pを25% v/v含むCOS細胞上清中またはP r P-A Pを25% v/v含むCOS細胞上清中で、3日間インキュベートした。P r P-A Pに接触させた培養細胞は、一貫してA Pに接触させた培養細胞よりも濃度が低く、P r P B P結合が細胞の成長または生存能力またはこの両方に影響することを示唆する。

図7は、クローン6のP r P B Pの核酸配列（配列番号1）および推定アミノ酸配列（配列番号2）である。

詳細な説明

P r P-A P融合蛋白を、P r P B Pのマーカおよび「親和性試薬」として機能するように構成した。新規のP r P B P群は選択マウス細胞系の表面上で検出された。これらP r P B P群は、競合的、飽和可能、かつ形態依存的な形式で、P r P-A P融合蛋白のP r P部分に高い親和性で結合した。

P r P結合蛋白検出システムの作成

P r P B P検出システムを作成するために、プリオン蛋白部分とアルカリフォスファターゼ部分とからなる可溶性組換え融合蛋白（P r P-A Pと称する）を

、ヒト胎盤から分泌された熱安定性のAPと、ネズミPrP遺伝子とをインフレームとなるように構成した(図1A)。ネズミPrPフラグメント(Locht et al., PNAS 83:6372-6, 1986; GenBank Accession #M13685)は、標準的PCRによってマウスの脳のcDNAから生成され、開始メチオニンから(従ってPrPリーダ配列を含む) GPI アンカー付着信号配列の最初のArg²²⁹まで(従ってGPI アンカーの付着を回避する)の完全長のオープンリーデンフレームが含ま

れている。この配列の増幅に用いたPCRプライマーは、

5' AGA CAT AAG CTT GCA GCC ATC ATG GC
G AAC CTT GGC 3' (前進プライマー) と、
5' GAG ATT GGA TCC TCT TCT CCC GTC GT
A ATA G 3' (逆向きプライマー) とであった。

これらのプライマーは適切な制限サイト(前進: HindIII、逆向き: BamHI)を含むように設計された。これは、カセット挿入部位の下流にAP遺伝子を含むAPtag-2発現ベクターのHindIII-BglIIサイト中へ連結させる(Cheng and Flanagan, Cell 79:157-168, 1994)ためである。PCR産生物がこのベクター中に連結されると、BamHI-BglII接合部は、融合蛋白のプリオン部分とアルカリフォスファターゼ部分との間にGly-Ser-Ser-Glyリンカーが挿入される。APtag-2発現ベクターは、SV40複製起点とCMVプロモータとを含み、COS細胞中でベクターの増幅と高レベルのタンパクの発現を可能にする。融合蛋白のAP部分にのみ結合する蛋白を検出可能となるが、この検出を制御するために、本来のリーダ配列を有するAPを、同様にCMVプロモータとSV40起点とを含むpCDNA1ベクターを用いて、発現させた(Invitrogen, San Diego, CA)。この構築体をCMV/SEAPと名付けた(図1B)。

PrP-AP融合蛋白はPrP^CおよびAP両方の免疫決定基を含む

COS細胞は、PrP-AP融合蛋白ベクターまたはCMV/SEAPベクターのいずれかを用いて、標準的なDEAE-デキストラン技術によってトランスフェクトされた。PrP-APがトランスフェクトされたCOS細胞上清(図2

、レーン3および4)を、 35 [S]-メチオニンでインキュベートし、APモノクローナル抗体を用いて(MIA 1801, human placenta; Medix Biotech, San Carlos, CA; lane 3)標準的技術(Antibodies, A Laboratory Manual, Harlow & Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1988)に従って免疫沈降させると、予想通り、97 kDに顕著なバンドを示し、これはAPの存在およびPrP-APの設計と一致する。PrPウサギポリクローナル抗体(Be

ndheim et al., Nature 310:418-21, 1984; lane 4)を用いた同じ上清の免疫沈降もまた97 kDバンドを形成し、PrP-APトランスフェクトされたCOS細胞系が、APおよびPrP抗体の両方と免疫反応する97 kDを分泌したことを示す。さらに、CMV/SEAPがトランスフェクトされたCOS細胞系上清(図2、レーン1および2)も、上記と同じく 35 [S]-メチオニンでインキュベートし、抗AP抗体(レーン1)を用いて免疫沈降させると、予想通り67 kD蛋白を発現し、その分子量は融合蛋白の設計と一致し、該蛋白中のAPの存在を示した。これら同一のCOS細胞系上清を、PrPに対するポリクローナル抗体を用いて免疫沈降した場合、67 kD蛋白は検出されず、CMV/SEAP蛋白内にプリオン部分がないことを示した。

PrP-APおよびAPはともに、トランスフェクトされたCOS細胞において、上清1 mlあたり約5 μ gの蛋白濃度で、発現かつ分泌され、どちらも同じ上清AP活性を呈した(Cheng and Flanagan, Cell 79:157-168, 1994で説明された方法で測定)。トランスフェクトされなかった、または疑似トランスフェクトされたCOS細胞系は、AP活性または免疫検出可能なPrP^Cは含まなかった。このデータは、PrP結合蛋白の分布、機能、および分子特性の決定に使用されるPrP-AP「親和性試薬」の構築および発現が成功したことを示す。

選択細胞系表面上のPrPBPsの検出

PrP-AP蛋白が細胞上のPrBPを検出可能かどうかを判断するために、マウス、ヒト、霊長類および神経/神経芽細胞腫細胞系由来の数種類の異なる細胞系を、60 mmプレート(約100,000個の細胞)中で、DMEM/10%のウシ胎仔血清(FCS)存在下で融合するまで培養した。これらの細胞を

リン酸緩衝溶液 (PBS) で洗浄し、DMEM/5% FCS または疑似トランスフェクトされたCOS細胞系由来の調整済み媒体にPrP-AP融合蛋白またはCMV/SEAP蛋白 (すなわちPrP部分が欠如している) を含む3mlのCOS細胞系上清で、室温で75~90分間インキュベートした。PrP-APトランスフェクトされた細胞上清は、平均5000D単位/時間のAP活性を発現し (Cheng and Flanagan, *supra*)、約5 μ g/mlのPrP-AP融合蛋白の存在

を示した。その後、細胞を洗浄、溶解し、65℃で10分間加熱して、内在ホスファターゼを不活性化し、アルカリフォスファターゼの活性を上記と同じく判定した。特にAP活性の判定は、ELISAリーダー (EAR 400 AT Easy Reader, SLT Instruments, Austria) によって、リン酸p-ニトロフェニルから転換した黄色い生成物を405nmで測定した。

3つの異なるマウス細胞系から入手した結果を図3に示す。NIH 3T3およびL929細胞は、胚性繊維芽細胞から得た。G8細胞はミオブラストイド (myoblastoid) (筋の系統)である。

やはり陽性反応を示したのは、ヒト神経芽細胞腫系SK-N-SHおよびSK-N-MCならびにグリオーマ細胞系U87およびU373、ヒト腎臓内皮 (HEK) 細胞、霊長類COS細胞、マウスおよびヒト末梢リンパ球、ならびにマウスおよびヒトの解離脳細胞であった。PrPBはほぼ遍在し、上記に示す種において制限的に観察された結合には見えない。しかし、これらは末梢赤血球およびアフリカツメガエルの卵母細胞には存在しなかった。

PrP-APトランスフェクトされたCOS細胞の上清からのPrP-AP融合蛋白でインキュベートした場合、熱処理したG8、NIH 3T3、およびL929細胞系で高いAP活性が検出された (図3の「prpap」参照)。この結果から、PrPBはG8、NIH 3T3、およびL929細胞系の表面上に豊富に存在し、PrP-AP融合蛋白由来のPrPと高い親和性で結合できることがわかる。これらのマウス細胞系を疑似トランスフェクトされた (つまりPrP-AP融合蛋白が存在しない、図3の「コントロール」参照) COS細胞の

上清からの調整済み培地でインキュベートした場合は、A P活性はほとんどまたはまったく検出されなかった。また、これらの細胞系をCMV／SEAPトランスフェクトされたCOS細胞からの上清でインキュベートした場合もA P活性はほとんどまたはまったく検出されず、G 8、NIH 3 T 3、およびL 9 2 9細胞系中でA P活性の増加が検出されるのは、P r P-A P融合蛋白のA P部分にのみ結合する他の蛋白ではなく、特定のP r P B Pが検出されるためであることを示す。これらの実験では、SEAPおよびP r P-A P上清は同じアルカリフォスファターゼ活性（1時間あたり-5000D単位）を含んでいた。筋細胞が

P r P B Pを高レベルで発現したことは、P r P^cを過剰に発現しているトランスジェニック動物中での筋細胞の選択的な弱さ（vulnerability）と一致する（Westway et al., Cell 76:117-129, 1994）。

他の技術を用いてP r P B Pを検出し、かつその細胞局在性を求めるために、間接免疫蛍光法を用いて懸濁液中の細胞をP r P-A P融合蛋白で標識した。細胞をプロテアーゼなしで機械的に解離し、ハンクス緩衝塩類溶液（HBSS）中で粉碎し、P r P-A PまたはA P蛋白で室温で60分間インキュベートし、氷冷HBSS中で3回洗浄し、その後、抗A Pモノクローナル抗体（MIA 1801, human placenta, Medix Biotech, San Carlos, CA）で30分間氷上でインキュベートした。その後、細胞を4℃に保ち、再び洗浄し、蛍光イソチオシアネートに結合されたヤギの抗マウスIgGでインキュベートし（Jackson Immunoresearch, Philadelphia, PA）、洗浄し、蛍光顕微鏡分析（Orthoplan蛍光顕微鏡上）またはフローサイトメトリー（Facsan;Becton Dickinson, Oakville, Ontario, Canada）によって検査した。

G 8細胞（マウス筋細胞系）の蛍光顕微鏡分析の結果を図4に示す。P r P-A P蛋白でインキュベートした場合は、G 8細胞の細胞表面がはっきりと標識された（図4、左パネル）が、A P蛋白では標識されなかった（図4、右パネル）。これらの結果は、G 8細胞の細胞表面上に特異的なマウスP r P B Pが存在することを示す。COS細胞、NIH 3 T 3細胞、およびL 9 2 9細胞等の他の細胞系も、G 8で説明したのと同じ結果を示した。

G8および他の細胞系の表面上でPrPBPに結合するPrPの特定の部位を同定するために、上記と同じ実験を行った。但し、ここではPrP蛋白の選択されたドメインに特異的なドメイン阻害抗体の存在下で行った。この目的のために有用なドメイン阻害抗体には、PrPカルボキシ末端に特異的な抗体（「蛋白質X」による種特異的な結合を決定すると仮定される、Telling et al., Cell 83: 79-80, 1995）、中間コドン領域96-176に特異的な抗体（PrP^CからPrP^{Sc}への認識-転換およびPrP^Cペプチドのアポトーシス特性に重要と仮定される、Forloni et al., Nature 362:543-546）、ならびにアミノ末端オクタペプチド反復領域（家族CJD中で顕著に現れる、Prusiner, Ann. Rev. Microbiol.

48: 655-686, 1994）に特異的な抗体などがある。結合ドメインの構造上の特徴およびアミノ酸配列を用いて、PrPBPに高い親和性で結合する他の物質を形成する。

PrPBP結合の特徴

PrPBPがPrPに競合的な形式で結合するかどうかを判定するために、上記で示したPrP-Ap結合活性を有する細胞系中で、³⁵[S] 標識されたPrP-Apを検査した。35mmの培養皿中で融合するまで成長させた細胞を、³⁵[S]-メチオニンで代謝的に標識されたCOS細胞の上清で、上記と同じくインキュベートした。その後、細胞を洗浄、溶解し、結合した放射能をβ-計数法で定量した。

NIH 3T3細胞についての結果を図5に示す。³⁵[S] 標識されたPrP-ApによるPrPBPへの結合は、インキュベートさせる非標識のPrP-Ap濃度を増加させることによって阻害され、標識されたPrP-Apが非標識のPrPによって競合的に置換されることを示す。さらに、³⁵[S] 標識されたPrP-ApによるPrPBPへの結合は、CMV/SEAp融合蛋白から由来したApの濃度増加によっては阻害されず、結合が融合蛋白のAp部分ではなくPrP部分で起こっていることを示す。

PrPBPとPrPとの間の結合親和性、および所与の細胞個体群上に存在す

る結合サイトの総数を求めるために、G8細胞を用いてChengおよびFlannaganの技術 (Cell 79:157-168, 1994) を変形した技術に従って、スキッチャード分析を行った。PrP-APおよびCMV/SEAPでトランスフェクトされたCOS細胞の上清をAmicon限外濾過細胞中で濃縮し、その後、HBHA緩衝液 (0.5 mg/ml BSA、0.1% NaN₃、20 mMのHEPES (pH 7.0) のハングスの平衡塩類溶液) 中で連続希釈した。リガンドの希釈シリーズで平衡インキュベーションを行った後、細胞をHBHA中で十分洗浄し、溶解し、上記で説明した結合AP活性を熱量測定的に解析した。K_d親和性調査のためにPrP-APの結合量および総量を求め、B_{max}判定 (細胞ごとの結合サイト数) をAPの特異的な活性から計算した (1 pmolのPrP-APは、解析条件下お

よびインキュベーション期間中は約3 OD単位に対応する)。精製した³⁵[S]標識されたPrP-APに特異的な結合量は、未標識のPrP-APとの競合から簡単に計算することができ、B_{max}値は³⁵[S]標識されたPrP-AP競合調査のXインターセプトから計算できる。コンピュータプログラムLIGANDを用いて、スキッチャードデータのグラフ化および分析を行った。G8細胞は解離定数 (K_d) 1.48×10^{-9} Mで 1×10^5 のPrP-AP結合サイトを有することがわかった。この高親和性結合は、特定の受容体-リガンド相互作用と一致する。

PrPの形態がPrPB Pへの高親和性結合にとって重要かどうかを決定するために、³⁵[S]標識されたPrP-APを100℃で5分間煮沸して、その形態を分裂させた。この処理はNIH 3T3細胞への結合を完全に切断し、PrP蛋白の形態がPrPB Pへの高親和性結合に重要なことを示す。

PrPとPrPB Pとの結合は細胞増殖および生存力に影響するような生物学的信号を形質導入する

PrPB Pの生理学的機能を求めるために、PrPB Pを含むことがわかってい

るG8筋細胞系をPrP-AP蛋白またはAP蛋白のいずれかでインキュベートして、細胞の増殖を測定した。24ウェルプレート中の姉妹G8培養細胞を、P

r P-A PまたはA Pを25% v/v含むC O S細胞上清中で3日間インキュベートした。2つの発現蛋白で3日間インキュベートした後、細胞を培養ウェル中の8つの高出力フィールド中でカウントした。その結果、G 8筋芽細胞系の自発増殖は、A Pのみの場合 (238 ± 24.5 細胞; $p = 0.002$, Mann-Whitney nonparametric test) に比べて、P r P-A Pが存在した場合 (64 ± 9.8 S E M細胞) において、より抑制された。

定性的には、P r P-A Pに接触させたG 8培養細胞は、A Pに接触させたものに比べて、より小さく、位相が暗く (phase-dark)、未吸着の (unattached) 細胞を含んでいるように見え、増殖の低下はおそらく細胞死が増えたためであることを示唆する (図6)。P r P-A Pに接触させたG 8培養細胞中で観察された細胞数の減少は、P r PのP r P B Pへの結合は細胞増殖を阻害する信号また

は細胞死を促進する信号を誘導することを強く示唆する。

P r P B Pの特徴

上述したP r P B Pが本当に蛋白であることを証明するために、姉妹N I H 3 T 3培養細胞を0.25%トリプシンの存在下また非存在下で、カルシウムを含まないH B S S中で30分間室温でインキュベートし、その後、P r P-A Pインキュベーションを行い、上記と同じく結合されたA P活性を熱量測定分析した。この比較的穏やかな蛋白質分解は、P r P-A Pの表面結合をバックグラウンドレベルまで完全に解離させるのに十分であった (ペアードt-テスト (paired t-test) によって $p < 0.001$)。これらの結果は、P r P B Pは本当に蛋白である、または少なくとも蛋白質のバックボーンに存在するという考えと一致した。

ライブラリの調製

2つのp c D N A 3.1プラスミドライブラリを、以下のようにG 8細胞から調製した。すべてのRNAをT R I z o l (GIBCO BRL) で抽出し、p o l y A +mRNAをO l i g o t e x d T (Qiagen) を用いて単離した。二重鎖c D N Aの合成は、d TまたはランダムヘキサマープライマーのいずれかでT i m e S a v e r c D N Aキット (Pharmacia) を用いて行った。その後、c D N

AをT4 DNAポリメラーゼで末端を平滑化し、Bam HIオリゴをアダプターとして接合させ、S-500カラム (Pharmacia) 上でサイズを細分画した。その後、サイズが選択されたcDNAをpcDNAα中へ連結し、ライブラリは標準的技術によって高効率のコンピテントE. Coli (Invitrogen) へエレクトロポレートされた。

プラスミドの調製、インビトロ転写、およびマイクロインジェクション

双方のpcDNA3.1プラスミドライブラリは、約 0.5×10^6 の独立クローンを含んでいた。PrPリガンドのmRNAの発現量は「中の下 (low mode rate)」(転写産物の0.01%内)であり、この発現量より次のようなことが

予想された。すなわち、正方向の完全長cDNAが細胞中の対応するmRNAのほぼ1/10の頻度でpCDNA3中でうまくクローニングされ得ると仮定すると、単独に陽性のクローンを同定するには、少なく見積って $1 \sim 5 \times 10^5$ 個のクローンの検査が必要と推定された。ライブラリをE. Coli中で増幅して、それぞれ1,500~2,000コロニー毎に集合(プール)体を形成した。各集合はレプリカ平板法を行い、一方のフィルタはプラスミドDNAの成長および調製に用い、他方は保存した。集合体由来のプラスミドは、プラスミドMIDIキット (Qiagen) を用いて調製し、mRNAはmMessage mMachine (Ambion, Austin TX) を用いて集合体からインビトロで転写されキャップされた。上記と同じくアフリカツメガエルの卵母細胞を調製し (Seguela, P. et al., J. Neurosci. 16: 448-455, 1996)、ナノリットル注射器 (World Precision Instruments) を用いて卵母細胞1個あたり50 nL (75~125 ngのmRNA) をマイクロインジェクション (微量注入) した。

PrP-BPのクローニングおよび特徴決定

10~20個の卵母細胞は500,000個分のG8細胞に相当するメンブレン領域を所有し、この上でPrP-AP結合を簡単に検出できると推定した。PrP-AP上清で4時間室温でインキュベートして卵母細胞のPrP-BP発現を注射後48時間モニターした。その後、卵をHBHAで6回洗浄した。細胞内皮ホスファターゼを不活性化させる均一加熱を加熱ブロック中で65℃で行った。

AP緩衝液(100mMトリ- HCl 、pH9.5、100mM NaCl 、5mM MgCl_2)中で0.33mg/mlのNBTおよび0.17mg/mlのBCIPで0.5~12時間インキュベーションして、結合AP活性を検出した。

すべての注入シリーズには、ベクター(p cDNA3.1、Invitrogen)のみを注入した卵からなるネガティブ対照と、ELF-1プラスミドクローン(Chang et al., 79:157-168, 1994)から調製し、MEK-4-AP融合蛋白を用いて検出したmRNAを注入した卵からなるポジティブ対照とが含まれた。

33の集合(約660のアフリカツメガエルの卵母細胞を含む)をスクリーニ

ングしたところ、どれも有意なPrP結合を示さなかったが、その後の34番目の集合のPrP-AP結合が陽性であることがわかった。その後の集合体もPrP結合は陰性であった。集合34は、適切なストックバクテリア培養物を希釈して、それぞれ約200のcDNAクローンを含む10の集合体に分別した。これらのうち、もっとも高いPrP結合を示した集合群を選択して、1つの陽性クローンが単離されるまでさらに分別を行った。結合活性をテストした32個のcDNAクローンのうち、クローン6がバックグラウンドに対して最高レベルのPrP-AP結合活性を示した。クローン7は並のPrP-AP活性を示した。

配列決定

クローン6および7中のcDNAインサートを標準的方法で配列決定した。

相同性検索のために、BLASTネットワークサーバ(National Library of Medicine)を用いて、EMBLおよびGENBANK核酸データベースの最新版を利用し、かつBLASTおよびBLITZネットワークサーバ(Heidelberg)の両方を用いて蛋白質データベースを調べた。

クローン6中のcDNAインサートは、プロトカドヘリン-43の一画分(プロトカドヘリン-43のアミノ酸67-252)をコードした。クローン6のこの部分の核酸および推定アミノ酸配列を図7に示す。プロトカドヘリン-43はサノラ(EMBO J. 12:2249-2256, 1993)に記載されている。プロトカドヘリン-43の配列情報は、GENBANK L11373(プロトカドヘリン-43)

で入手できる。

クローン7中のcDNAインサートは、OB-カドヘリン-1の一部分（アミノ末端カドヘリン反復）をコードしていた。OB-カドヘリン-1はオザキら（J. Biol. Chem. 269:12092-12098, 1994）に記載されている。OB-カドヘリン-1配列情報は、DBJ D21253（マウスOB-カドヘリン）およびSwissProt P55287（ヒトOB-カドヘリン）より入手できる。

一次および二次スクリーニング規準に合致するクローンが同定されると、一連の実験を行う。例えばノーザンブロット分析を行って、ハイブリッド形成するmRNA種のサイズを明らかにしたり、またサイズの異なる複数の関連のある転写

産物写しがあるかどうかを判断する。異なる細胞、臓器、および種のノーザンブロット、ならびに異なる進化および疾患状態（特にマウススクレイピー）の組織を用いるブロットは、PrPBの細胞特異性および調節に関する重要な情報を与える。細胞表面のPrP-AP結合とPrPB発現との間の差は、PrPBを可溶性型として発現する細胞があることを示唆する。さらに、アミノ酸配列を用いて、PrPBに対する有効な抗体プローブの生産を容易にする免疫性配列が同定される。また生理学的に適切なPrPBの配列を同定することで、プリオン疾患およびその他の神経変性疾患の理解をさらに深め、かつ相互作用を阻害する小分子治療物の開発、またはこれらの疾患の治療としてこの形質導入分子を不活性化させる様々な研究が可能となる。

または、PrPBは、PrP-AP親和性カラムおよび標準的カラム精製技術を用いて、PrPB蛋白の精製によってクローニングしてもよい。有用なPrPB源には、組織、細胞、またはメンブレンのホモジェネートがある。カラム単離の後、PrPBの特徴を生化学的に決定され、分子量、pK、およびグリコシル化等の特性についての情報を与える。さらに、この蛋白をミクロ的に配列決定して、データベースの検索と、変性オリゴヌクレオチドおよび標準的なハイブリッド形成スクリーニングまたはPCR増幅技術を用いるcDNAクローニングとを容易にすることができる。

カドヘリン

カドヘリンは初期においては、カルシウム依存性でホモフィリックな細胞間接着分子であり、発生学的形成および組織の維持における細胞間認識および接着現象にて、他のファミリーの接着分子（インテグリン、免疫グロブリンファミリー接着分子、およびセ렉チンを含む）と共同で作用すると認識されていた。

カドヘリンスーパーファミリーは、細胞外の「カドヘリンモチーフ」（約110個のアミノ酸を有する）の所有によって規定される多種の蛋白のグループである。「カドヘリンモチーフ」は、折りたたみ構造によって反復するドメインを有し、免疫グロブリン折りたたみ構造と一部同様の三次構造的特徴を有する。それと対照的に、カドヘリンの細胞質ドメインは著しく多様であり、これらの分子の

広く異なる機能を反映している。配列相同性分析からの示唆によれば、カドヘリンスーパーファミリーは、標準的カドヘリンおよびプロト（原形）カドヘリンの、少なくとも二つのサブファミリーを含むと考えられる。他の見解によればカドヘリンは、標準的カドヘリン、デスモソーム用カドヘリン、プロトカドヘリン、およびカドヘリンに関連した他の蛋白の、四つの機能的サブグループに分けられる（Suzuki, J. Cell. Biochem. 61:531-542, 1996）。

最初に認識されたカドヘリンは、E-カドヘリン（またはウボモルリン）であり、発生の初期段階において、割球のカルシウム依存性の圧密化（compaction）に介在することが発見された。初期の標準的カドヘリンは全て、五つの細胞外カドヘリンドメインを有するホモフィリックな接着分子であった。このグループにはさらに、M-カドヘリン、N-カドヘリン、P-カドヘリン、およびR-カドヘリンが含まれる。より最近に発見された標準的カドヘリン（これらによりサブファミリーを構成するかもしれない）は、カドヘリン5～13を含む。これらの新しい非典型的な「標準的」カドヘリンのいくつか（カドヘリン5および8を含む）は、L細胞に形質導入されたときにはホモフィリックな結合作用を実施しないようである。しかし同じカドヘリンは、細胞間の接触点にてカルシウム依存性の局在化を示し、ヘテロフィリックなリガンドの存在を示唆する（Suzuki, J. Cell. Biochem. 61:531-542, 1996）。ホモフィリックな結合を示す標準的カドヘリンでさえも、ヘテロフィリックな結合リガンドを有すると考えられる。これは、イ

ンテグリン $\alpha E \beta 7$ が E-カドヘリンと結合すること (Cepek, Nature 372:190-193, 1994)、および繊維芽細胞増殖因子が N-カドヘリンと結合することによって示唆される。

カドヘリンのヘテロフィリックなリガンドが、今後さらに多数同定される可能性が高い。我々は、PrP-AP 融合蛋白を検出試薬およびカエル卵母細胞の発現システムとして用い、プリオン蛋白がカドヘリン蛋白にとっての新たなリガンドとして作用することを実証した。

標準的カドヘリンの接着部位および特異性決定部位は、カドヘリンの最も多い N 末端ドメインである EC 1 に含まれると考えられている (Shapiro et al., Nature 374:327-337, 1995)。大多数の標準的カドヘリンの細胞質ドメインにおける

C 末端は、よく保全され、カテニンに対するそれらの結合を反映している。そしてそれにより、細胞の細胞骨格を表している (Ozawa et al., 1990, Hirano et al., 1992)。例外は、T-カドヘリン (カドヘリン-13) およびカドヘリン 8 のスプライスバリエントである。カドヘリン 13 は、膜貫通ドメインを有さず、プリオン蛋白と同様に、グリコシル-ホスファチジルイノシトールの末端を介して細胞表面に結合する。カドヘリン 8 は細胞によって、膜アンカー手段が完全に欠如した溶解性アイソフォームとして分泌されることがある (Suzuki et al., 1996)。

プロトカドヘリンは、特徴づけが不完全な大きな蛋白グループであり、カドヘリンの細胞外ドメインを有する点で、標準的カドヘリンとの相同性がある。しかし、特徴づけられたプロトカドヘリンは全て、五つより多くのカドヘリンドメインを有するようであり、標準的カドヘリンのドメイン EC 3 および EC 5 との類似が最も際立っている (Sano et al., EMBO J. 12:2249-2256, 1993)。このように、標準的カドヘリンの EC 1 結合モチーフは、プロトカドヘリンには含まれない。当然の結果として、プロトカドヘリンのホモフィリックな接着作用は、この蛋白ファミリーの全ての既知の蛋白によって実施されるわけではない。

プロトカドヘリンはまた、標準的カドヘリンのものとは異なる、多様な細胞質ドメインを有する。このことは、プロトカドヘリンの特別な機能的役割を示唆す

る。したがって、プロトカドヘリンは、現在知られていない新規のヘテロフィリックな分子に結合すると仮定されてきた。

カドヘリンの機能は、現時点では全ては解明されていない。いくつかの標準的カドヘリンは明らかに、発生の細胞層分離および形態形成に関与している。N-カドヘリンは、軸索の伸長において重要な役割を果たす。カドヘリンはまた、成熟した組織における細胞間認識の維持に関与する。さらに、転移ガンなどの、認識が欠乏する疾病に関与すると考えられる。ベータカテニンのために、wntガン原遺伝子生成物と競合することから、腫瘍形成での役割が示唆される。天疱瘡は、デスモソーム用カドヘリンの免疫認識が介在する自己免疫性疾患である。カドヘリンはさらに、神経変性疾患、筋肉疾患、および免疫学的疾患に関与する可能性がある。プリオン蛋白のカドヘリンとの結合への関与は、プリオン蛋白のカドヘリン機能への作用、またはカドヘリンのプリオン蛋白機能への作用を、妨害

または促進する作用剤の開発につながる。

PrPB PのPr Pとの結合はカルシウム依存性である

標準的カドヘリンは、カルシウム依存性のホモフィリックな細胞間接着への関与を通じて初めて認識された。さらなる研究により、カルシウムは接着相互作用自体には必要ないが、カドヘリンの折りたたみ構造間のカルシウム結合部位と反応することによって、その分子を細胞表面上でより堅固で安定したものにする事が明らかになった (Shapiro et al., Nature 374:327-337, 1995)。ホモフィリックな結合相互作用に関与しないカドヘリンファミリー構成物でさえ、カルシウムによって誘発されることによって細胞間接着点に局在化する(このことは、ヘテロフィリックなリガンドへのカルシウム介在の結合を示唆する)。

最初にG8およびCOS細胞の表面上にて同定されたPrPB Pが、カルシウム依存性結合というカドヘリン蛋白の主要な特徴を有するかどうかを更に調査するために、以下の実験を行った。PrP-AP上清を2 mMのEDTA (エチレンジアミン四酢酸)を用いて室温で2時間培養して、その培地内のカルシウムをキレート化した。並行して、集密的COSおよびG8細胞を、1 mMのEDTAを含むPBS (リン酸緩衝化生理食塩水)の中で5分間培養して、細胞を容器の

底から引き離した。続いて細胞を、DMEM 5% FCS (ウシ胎仔血清) 内で一回洗浄した。コントロール細胞は、1.3 mMのCaCl₂および1 mMのMgCl₂のみを含むHBHAの中で培養した。その間実験細胞は、1 mMのEDTAを含むPBSの中で室温で30分間培養して、その培地内のカルシウムを除去した。第一のグループであるネガティブコントロール細胞は、ペレット状にして (pelleted) DMEM 5% (PrP-APを含まない) の中に再度懸濁させた。第二のグループであるポジティブコントロール細胞 (培地にカルシウムが存在する)、および第三のグループである実験細胞 (EDTAで処理された) は、EDTA処理されたPrP-APの中で室温にて1.5時間再度懸濁させ、その後コントロール (非放射性的) HBHA内で三回洗浄した。続いて、これらの細胞を前述したとおりに溶解し、これらの細胞の上清におけるPrP-AP作用を検査した。

カルシウムキレート化剤であるEDTAの存在下では、COSおよびG8細胞

の双方への結合は有意に減少していた (COSおよびG8細胞の双方において、 $p < 0.0001$, $N = 6$)。これは、最適な結合のためにはCa²⁺などの二価の陽イオンの存在が必要であることを示す。

PrPB PのPrPとの結合は、カルシウムに依存した、トリプシンに対する耐性を示す

カルシウムとの結合によって、いくつかのカドヘリンは、トリプシン消化から保護される (Takeichi, J. Cell. Biol. 75:464-474, 1977)。これはおそらく、カルシウム結合が、プロテアーゼ感受性部位を遮断する構造的変化を誘発することによる。

最初にG8およびCOS細胞の表面上にて同定されたPrPB Pが、カルシウム存在下での蛋白質分解に対する耐性というカドヘリン蛋白の主要な特徴を有するかどうかを更に調査するために、以下の実験を行った。集密的な (コンフルエントな) COSおよびG8細胞を、0.25%トリプシンおよび10 mMのCaCl₂、もしくは0.25%トリプシンおよび1 mMのEDTAを含むPBSの中で、37℃で20分間培養し、その後DMEM 5% FCS内で三回洗浄した。

1本のエッペンドルフチューブ (eppendorf tube) 当たり約 1×10^6 個の細胞が分布しており、これらの細胞をHBHA培地で二回洗浄した。細胞をPrP-AP上清を用いて室温で1.5時間培養し、その後コールドHBHA内で三回洗浄した。続いて細胞を氷上で、50mMのトリス、150mMのNaCl、1%トリトン-X100、0.02%NaN₃ (pH8.0)の中に懸濁した。その懸濁液を、マイクロ遠心分離した。上清は、加熱ブロック上で65℃にて12分間均一に加熱し、内因性細胞ホスファターゼを不活性化した。結合APの作用が、AP緩衝液(100mMのトリス-HCl (pH9.5)、100mMのNaCl) 5mMのMgCl₂で、0.5から12時間)の中で、NBTおよびBCIPを用いて検出された。

Ca²⁺イオンの存在下では、PrP-APのCOSおよびG8細胞との結合は、PrP-APを用いた培養に先立って細胞をトリプシン処理したにもかかわらず保持された。Ca²⁺が不在の場合には、PrP-AP結合には有意の減少が見ら

れた(COS細胞において $p < 0.001$ 、G8細胞において $p < 0.05$ 、 $N = 4$)。このデータは、COSおよびG8細胞の表面上のPrPB類が、Ca²⁺の存在下ではトリプシンによる蛋白質分解から保護されるという、カドヘリン分子の既知の特徴を示す(Takahashi et al., Oncogene 8:2925-2929, 1993)。したがって、このデータは、PrPがカドヘリンファミリー構成物に結合するという見解を支持する。

ヒトPrPBの単離およびクローニング

ヒトPrPBは、マウスのそれに関して上述したと同様に単離できる。詳細には、組換えヒトPrP-AP融合遺伝子は、マウスPrP遺伝子の代わりにクレツシュマーら(Kretzschmar et al. DNA 5:315-324, 1986)によって説明されるヒトPrP cDNAを用いて、本質的に上述のとおり構築される。ヒトPrPフラグメントは、以下のプライマを用いてスタンダードなPCR増幅によって生成される：

5' AGA CAT AAG CTT GCA GCC ATC ATG GC

G AAC CTT GGC 3' (前進プライマ) ; および
 5' GAG ATT GGA TCC TCT CTG GTA ATA GG
 C CTG 3' (逆向きプライマ)。

続いてこのフラグメントは、APタグー2発現ベクターの中へインフレームとなるようにクローン化される (Cheng and Flanagan, supra)。このベクターから発現された融合蛋白生成物を用いて、上述のいずれかのアフィニティ技術によって (例えばヒトPrPBP産生細胞からの沈降によって)、ヒトPrPBPは単離される。単離された蛋白が実際にヒトPrPBPであるかの検証も、上述のとおり実施できる。

単離後、ヒトPrPBP蛋白はミクロ的に配列決定してもよい。このアミノ酸配列は、ハイブリッド形成スクリーニングのためのオリゴヌクレオチドの設計に使用してもよく、もしくはいずれかの適切なヒトcDNAまたはゲノムDNAライブラリーからのヒトPrPBPをコードする配列の増幅のためのPCRプライマの設計に使用してもよい。

代替案としては、ヒトPrP-AP融合蛋白を使用して、pcDNA3.1クローニングシステムおよび上述の技術によって、ヒトPrPBPを発現するcDNAクローンを単離することができる。もしくは好ましくは、さらに他の代替技術において、マウスPrPBPをコード化する配列 (上述したもの) をプローブとして用いて、ヒトの脳cDNAライブラリーの、低減された緊縮条件下でのスクリーニングを実施する。ここでも、ハイブリッド形成プローブとしてマウスPrPBP配列を使用してもよいし、または異なる種間で保全されるであろうマウスPrPBP配列の領域に基づいてPCRプライマを設計し、それをヒト配列の増幅に使用することが可能である。

PrPBP蛋白の発現

本発明によるPrPBPは一般的に、適切な発現担体に含まれる、PrPBPをコードするcDNAフラグメントの全体または一部を用いて、適切な宿主細胞を形質転換させることにより生成される。

分子生物学の分野において知識を有する者にとっては、組換え蛋白を供給する

ために、多様な発現システムのいずれを使用してもよいことは明らかであろう。本発明にとって、厳密にどのホスト（宿主）細胞を使用したかは決定的事項ではない。PrPB Pは、原核細胞ホスト（例えばE. coli）または真核細胞ホスト（例えばSaccharomyces cerevisiae）例えばSf21細胞である昆虫細胞、もしくは、例えばNIH 3T3、HeLa、または好ましくはCOS細胞である哺乳類細胞）において産生される。このような細胞は、多様な供給元から入手できる（例えばAmerican Type Culture Collection, Rockland, MD; さらに、例えばAusubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, 1994を参照のこと）。形質転換または形質導入の方法、および選択する発現方法は、選択したホストシステムによって決まる。形質転換またはトランスフェクションの方法は、例えばAusubel et al. (supra)に記載されている。発現担体は、例えばCloning Vectors: A Laboratory Manual (P.H. Pouwels et al., 1985, Supp. 1997)に記載されたものから選択できる。

代替案として、PrPB Pは、安定して形質導入された哺乳類細胞系によって産生されることもできる。哺乳類細胞の安定した形質導入に適した数々のベクターが、一般的に入手可能である。例えば、Pouwels et al. (supra)を参照されたい。このような細胞系の構築方法も、例えばAusubel et al. (supra)などから一般的に入手可能である。一例として、PrPB PをコードするcDNAは、ジヒドロ葉酸レダクターゼ（DHFR）遺伝子を含む発現ベクター内にクローン化される。プラスミドの、およびそれに従ってPrPB Pをコードする遺伝子の、ホスト細胞の染色体への組込みは、細胞培養液に0.01~300 μ Mのメトトレキセートを含有させること（Ausubel et al., supraに記載されたとおり）によって、選択される。この優性選択は、多数の細胞の種類において実施することができる。形質導入された遺伝子のDHFR介在による増幅によって、組換え蛋白の発現を増加させることができる。遺伝子増幅を担う細胞系の選択方法は、Ausubel et al. (supra)に記載されている。これらの方法は一般的に、培地中のメトトレキセートの含有レベルを徐々に増加させながら、長時間の培養を行う。本目的で一般的に使用される、DHFRを保持する発現ベクターは、pCVSEII-

DHFRおよびpAdD26SV (A) (Ausubel et al., supraに記載されたとおり)を含む。上述した宿主細胞のいずれか、または好ましくはDHFRを欠失(欠損)したCHO細胞系(例えばCHO DHFR⁻細胞、ATCC Accession No.CRL 9096)は、安定して形質導入された細胞系のDHFR選択、またはDHFR介在の遺伝子増幅のために好ましい宿主細胞である。

組換えPrPBpは発現させた後は、例えばアフィニティー・クロマトグラフィによって単離される。一例としては、抗PrPBp抗体(例えば本明細書に記載したとおりに生成したもの)をカラムに付着させることにより、PrPBpの単離に使用できる。アフィニティー・クロマトグラフィに先立って、PrPBpを保持している細胞の溶解および分別は、スタンダードな方法によって実施してもよい(例えばAusubel et al., supra参照のこと)。

組換え蛋白は単離後、必要であれば、例えば高性能液体クロマトグラフィによってさらに精製できる (Fisher, Laboratory Techniques In Biochemistry And Molecular Biology, eds., Work and Burdon, Elsevier, 1980参照のこと)。

本発明のポリペプチド、特に短いPrPBpフラグメントは、化学的合成によっても生成できる(例えばSolid Phase Peptide Synthesis, 2nd ed., 1984 The pierce Chemical Co., Rockford, ILに記載の方法による)。

ポリペプチドの発現および精製に関する以上の一般的な技術は、有用なPrPBpフラグメントまたはそのアナログ(本明細書に記載のもの)の生成および単離にも使用できる。

抗PrPBp抗体

PrPBpに特異的な抗体を生成するために、PrPBpをコードする配列は、そのC末端融合としてグルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)を発現させてもよい (Smith et al., Gene 67:31-40, 1988)。融合蛋白は、グルタチオンセファロースのビーズ上で精製され、グルタチオンで溶出され、トロンピンを用いて(操作した分裂部位において)分裂され、そしてウサギを免疫感作するに必要な度合いまで精製される。一次免疫は完全フロイントアジュバンドを用いて実施され、続く免疫感作は不完全フロイントアジュバンドを用いて実施される。

抗体価の変化は、GST-PrPBP融合蛋白のトロンビン分裂されたフラグメントを用いて、ウェスタンブロット法および免疫沈降分析法によって監視される。免疫血清は、CNBrセファローズが結合したPrPBP蛋白を用いてアフィニティ精製される。抗血清の特異性は、関連のないGST蛋白のパネルを用いて判定される。

GST融合蛋白の代替または補助免疫原として、PrPBPの比較的ユニークな免疫原性領域に相当するペプチドを生成し、導入されたC末端のリシンを通じてKLH (keyhole limpet hemocyanin) と結合させることができる。これらの各ペプチドに対する抗原は、BSAに抱合されたペプチド上で同様に、アフィニティ精製される。特異性は、ペプチド抱合体を用いてELISAおよびウェスタンブロット法によって検査される。また、GST融合蛋白として発現したPrPBPを使用してウェスタンブロット法および免疫沈降法によって検査される。

代替案として、モノクローナル抗体を、上述のPrPBPおよびスタンダードなハイブリドーマ技術を用いて生成してもよい（例えばKohler et al., Nature 256:495, 1975; Kohler et al., Eur. J. Immunol. 6:511, 1976; Kohler et al., Eur. J. I

mmunol. 6:292, 1976; Hammerling et al., In Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridomas, Elsevier, NY, 1981; Ausubel et al., supraを参照のこと）。生成後、モノクローナル抗体も、ウェスタンブロット法および免疫沈降分析法によって（Ausubel et al., supraに記載の方法によって）PrPBP特異的認識が検査される。PrPBPを特異的に認識する抗体が、本発明においては有用とされる。このような抗体は例えば、哺乳動物が産生するPrPBPのレベルを監視するイムノアッセイにおいて利用できる（例えば、PrPBPの量または亜細胞性位置を検出するため）。他の代替手順として、モノクローナル抗体は、上述のPrPBPおよびファージディスプレイライブラリーを使用して生成することができる（Vaughan et al., Nature Biotech 14:309-314, 1996）。

本発明の抗体は好ましくは、一般的に保全される領域外に位置し、電荷を有する残基の高頻度の発生などを基準として抗原性を示すと思われる、PrPBPのフラグメントを使用して生成される。具体的な一例として、これらのフラグメン

トはスタンダードなPCRの技術によって生成され、pGEX発現ベクター内にクローン化される (Ausubel et al., supra)。融合蛋白はE. coli内に発現され、Ausubel et al.に記載されるとおり、グルタチオンアガロースの親和性マトリックスを用いて精製される。発生し得る問題である抗血清の低親和性または特異性を最小限にする試みとして、各蛋白に対しこのような融合体を二つまたは三つ形成し、各融合体を少なくとも二匹のウサギに注入する。抗血清は、好ましくは少なくとも三回の追加免疫注入を含む一連の注入により産生される。

プリオン疾患検出アッセイ

PrPBPは一般的に、プリオン疾患の検出または監視において有用である。PrPBPは例えば、スタンダードな検出アッセイによって生物学的サンプル（例えば組織生検または体液）内にPrP^{Sc}が存在するか否かの監視をするために利用できる。ここで言う検出アッセイは、例えば標識されたPrPBP、標識されたPrPBP融合蛋白、または標識されたPrP^{Sc}などの、検出可能に標識された要素に依存する方法を含むが、それに限られない。本発明による検出アッセイは、PrP^{Sc}の直接検出を含むことができ、または間接検出（例えば、Pr

PBPをPrPに結合し、その後PrPBPに対抗させる第二の標識された抗体を用いて、その複合体を検出することによる）を含むことができる。これらの検出方法に使用するPrPBP（例えばマウスまたはヒトPrPBP）は、組換えによっていずれかの細胞内で産生されるが、ホスト細胞としてはCOS細胞が好適である（例えばCullen, Meth. Enzymol. 152:684-704, 1988の方法によれば）。代替案として、PrPBPは、PrP-Ap蛋白およびスタンダードな技術を用いてアフィニティ精製によって単離できる。一つの特に好適な実施形態では、本発明の検出方法において、溶解性PrPBP結合ドメインが発現され使用される。他の好適な実施形態では、PrPBP結合ドメインは、マウスおよびヒトPrPBPコード化配列の双方を含む融合蛋白として発現される。これらの融合蛋白は同様に、前述した検出方法で使用される。

一つの実施例においては、プリオン病原体を含むことが判明しているまたは疑われている生物学的サンプルは、以下のように検査される。生物学的サンプルは

、スタンダードな技術に従いプロテアーゼで処理される（例えばPrusiner et al., Science 216:136-144, 1982に記載のとおり）。プロテアーゼ不活性化処理後にサンプルは、既知の濃度にて存在する、検出可能に標識されたPrPBP（またはフラグメントまたはそのアナログ）またはPrPBP融合蛋白のどちらかを用いて培養される。そこで得られた複合体は、例えばフィルタ結合、免疫沈降法、ゲル電気泳動分離、沈降、または濾過などによって単離または同定される。単離された複合体は続いて、スタンダードな方法に従い分析され測定される。これらの検出アッセイにおいては、直接的または間接的に可視化されるいずれの適切な標識を用いてもよい。これらの標識には、いずれの放射性、蛍光性、染色原性（chromogenic）（例えばアルカリフォスファターゼまたは西洋ワサビペルオキシダーゼ）、または化学発光性標識、もしくは、標識されたハプテン特異的抗体または他の結合物質（例えばアビジン）を用いて可視化されるハプテン（例えばジゴキシゲニンまたはビオチン）が含まれるが、それらに限られない。免疫学をベースにした解析が実施される場合、（上述の）PrPBPまたはPrP（Bendheim et al., Nature 310:418-21, 1984）に対抗するよう生成されたポリクローナルまたはモノクローナル抗体を、いずれのスタンダードなイムノ解析の形態（例

えば、ELISA）ウェスタンブロット法、またはRIA解析）にて使用でき、それにより複合体形成を測定できる。このようなイムノ解析の例は、例えばAusubel et al., supraに記載される。適切なコントロールサンプルに比べて、標識された複合体を高いレベルで含むと判定されたサンプルは、プリオン蛋白が存在していること、すなわちプリオン関連疾患の罹患を示している。

他の検出解析では、生物学的サンプル内のPrP^{Sc}は、固形支持体（例えばニトロセルロース、イモビロン、アガロースビーズ、シアンに活性化されたアガロース、または組織培養ウェル）上で担持され、PrPBP（またはフラグメントまたはそのアナログ）またはPrPBP融合蛋白による結合が検出される。代替形態では、PrPBPまたはPrPBP融合蛋白は固形支持体に固定され、PrP^{Sc}の結合が検出される。これらの解析形態では、上述のとおりいずれのスタンダードな方法によって検出が実施されてもよく、例えば固形支持体に関与してい

るPrP^{Sc}の検出は、前述のとおりPrPB Pを用いて直接的または間接的に実施される。代替案として、捉えられたPrP^{Sc} : PrPB P複合体内のPrP^{Sc}は、PrP^{Sc}に対抗する抗体を用いて検出できる (Bendheim et al., Nature 310:418-21, 1984)。同様に、放射性または蛍光性マーカー、もしくは代わりにアルカリフォスファターゼまたは西洋ワサビペルオキシダーゼを含む（がそれに限られない）酵素マーカーなどの、いずれかの適切な標識を使用できる。そして検出は、染色原性または蛍光原性基質を添加することにより実施できる。

上記のように、PrP^Cと結合するがPrP^{Sc}とは結合しないPrPB Pは、生物学的サンプルからPrP^Cを除去することに使用できる。サンプル内に残存するPrP^{Sc}は、例えばPrP^{Sc}およびPrP^Cの双方に結合する抗体などの試薬に結合させることにより定量できる。このように、PrP^Cと結合するがPrP^{Sc}とは結合しないPrPB Pであっても、PrP^{Sc}用の解析において使用できる。

さらに他の検出解析では、検出可能に標識されたPrP^{Sc}はPrPB Pを用いて培養され、その後PrP^{Sc}を含むことが疑わしい生物学的サンプルと共に培養される（もし所望であれば、プロテアーゼ処理後）。この結果得られた複合体は、上述のとおり通常の方法に従って測定および定量化される。この解析形態では、

コントロールサンプルとの比較で、PrP^{Sc} : PrPB P複合体内の標識されたPrP^{Sc}の存在の減少が見られると、生物学的サンプル内にPrP^{Sc}が存在することを示すと理解される。それは、サンプル内の標識されないPrP^{Sc}が、複合体内の標識されたPrP^{Sc}を競合的に置換するからである。

プリオン除染

本明細書で説明する方法および構成は、プリオン蛋白による汚染が明らかな又は疑わしい生物学的サンプルの除染に有用である。詳細に言えば、PrPB PはPrP^{Sc}に結合可能なため、生物学的サンプルをPrPB Pと共に培養し、例えば二次隔絶法 (secondary sequestration) または分離法などのスタンダードな方法を用いてPrPB P複合体を除去することができる。代替案として、単純に

、PrPB_Pを生物学的サンプルと共に培養し、PrPと複合させ、それによってPrPの影響を阻止してもよい。

プリオン関連疾患および他の神経変性疾患の治療

本発明の方法および構成は、ヒトを含む哺乳類のプリオン疾患の治療および防止手段を提供する。この治療は、例えばPrPB_P：PrP^{Sc}複合体形成に関連する生物学的現象を阻害、抑制、低減、または中和するアンタゴニストを用いて動物を治療することによって、直接実施してもよい。このようなアンタゴニストは、本発明の分子および機能的解析を用いて単離することができる。例えば本発明は、PrPB_P：PrP^{Sc}複合体の相互作用に拮抗可能な物質（例えばペプチド、小さな分子の阻害物質、または疑似体）を同定する手段を提供する。これらのアンタゴニストには以下を含むが、それに限られない：PrPB_P；PrP^{Sc}と結合してPrP^{Sc}の生物学的作用を制限および不活性化するPrPB_Pフラグメントまたはアナログ；抗PrPB_P抗体；PrPB_Pと相互作用して、PrPB_P-PrP複合体形成を阻止することにより、その複合体形成に起因する一連の生物学的作用を妨害するPrP、PrP^{Sc}、またはPrP^Cのフラグメントもしくはアナログ；PrP^{Sc}、PrPB_P、またはPrPB_P：PrP^{Sc}複合体形成に関連する生物学的作用を干渉および阻止し、例えば細胞抽出物、哺乳類血清

、
または哺乳類細胞が培養されている生育培地に存在する、薬学的物質を含むペプチドまたは非ペプチド分子。

本発明に有用なアンタゴニスト分子には、以下を含む：高親和性をもってPrP^{Sc}に結合し、PrP^{Sc}を、PrP^Cからの更なる自身のコピーの補充が不可能な状態にさせる能力を有するものとして選択された分子；高親和性をもってPrP^Cに結合し、そのPrP^{Sc}への転換を阻止することが可能な分子；PrP^CとPrP^{Sc}またはその複合体との相互作用を阻止することにより、細胞毒性シグナルの生成を阻止することが可能な分子；隣接するPrP^C発現細胞による溶解性の毒性媒介物（例えば活性酸素類および腫瘍壊死因子）の生成を妨害することが可能な分子；またはこれらの前述の機構のいずれかの組み合わせ。

例えばPrPBPである候補のアンタゴニストの効力は、プリオン蛋白と相互作用する能力に依存する。この相互作用は、スタンダードな結合技術および機能的解析（例えば本明細書に記載のもの）をいくつでも用いて容易に分析される。一つの具体例として、候補のアンタゴニストは、インビトロでPrP^{Sc}との相互作用が検査される。候補のアンタゴニストの、PrP^{Sc}が介在する生物学的作用を変調する能力は、本明細書に記載の機能的テストのいずれによっても分析できる。

本発明においては、PrPBP:PrP^{Sc}複合体形成の減少、またはPrPBP:PrP^{Sc}が介在するインビトロでの生物学的作用の減少を促進する分子は有用だと考えられる。このような分子は、例えばプリオン疾患の発生を治療または防止する治療物質として利用できる。

テストアンタゴニストが生体内インビボでプリオン疾患の発生に対する保護を供与するかどうかの評価は通常、このような疾患が発生すると知られている動物を使用して行われる（例えば、Chandler, Lancet 6:1378-1379, 1961; Eklund et al., J. Infectious Disease 117:15-22, 1967; Field, Brit. J. Exp. Path. 8:129-239, 1969）。適切な動物（例えばマウスまたはハムスタ）は、スタンダードな方法に従ってテスト物質で処理される。そして、未処理のコントロール動物との比較で、プリオン関連疾患の発病率の減少または発生の遅延が、保護を表す指標として検出される。テスト物質は、以前にプリオン病原体が注入された動物に投与

してもよい。またはその代わりに、プリオンおよびテスト物質を事前培養し、プリオン/テスト物質混合物をテスト動物に注入することにより、テスト物質のプリオン病原体を中和する作用を試験してもよい。プリオン疾患の治療または防止に利用される分子（例えば上述のアンタゴニスト）は、「抗プリオン治療物質」と称される。

本発明による抗プリオン治療物質は、薬学的に容認される希釈剤、キャリア、または賦形剤と共に、投薬単位の形状で投与してもよい。例えば典型的な薬学的実施手法を用いてもよく、それによりこのような抗プリオン治療物質を、プリオン疾患を患うまたはその症候を表す前段階にある、もしくはプリオン疾患の発生

の危険がある動物に投与するために適切な製剤または組成物を提供することができる。いずれの適切な投与の経路を使用してもよく、例を挙げると、非経口、静脈内、皮下、筋肉内、頭蓋内、眼窩内、眼内、心室内、包（関節包）内、脊髄内、（クモ膜下）槽内、腹腔内、鼻腔内、エアロゾール、または経口の投与が考えられる。

当業界で周知の製剤作成方法は、例えば”Remington's Pharmaceutical Sciences”に記載される。非経口の投与用の製剤は例えば、賦形剤、滅菌水または塩水、ポリエチレングリコールなどのポリアルキレングリコール類、野菜由来の油類、もしくは水素添加したナフタレンを含むことが可能である。抗プリオン治療物質の放出を制御するために、生物学的適合性があり生分解性のラクチドポリマー、ラクチド／グリコリドのコポリマー、またはポリオキシエチレンーポリオキシプロピレンのコポリマーを使用できる。抗プリオン治療物質の、他の本質的に有用な非経口の放出システムは、エチレンービニルアセテートのコポリマー粒子、浸透ポンプ、埋込み可能な注入システム、およびリポソームを含む。吸入用の製剤は例えばラクトースなどの賦形剤を含んでもよい。または、例えばポリオキシエチレンー9-ラウリルエーテル、グリココレート(glycocholate)、およびデオキシコレート(deoxycholate)を含む水溶液でもよい。もしくは、点鼻薬の形状での投与のための油性溶液か、ゲル状であってもよい。

本発明の方法は、例えばヒト、家庭向きのペット、または家畜などのいずれの動物においても、本明細書に記載の疾病を減少させるまたは防止することに利用

できる。ヒトでない動物の治療の場合、使用する抗プリオン治療物質は、その類に特異的であることが好ましい。

他の実施形態

本発明は一般的に、PrP-AP融合蛋白を用いて本明細書に記載のとおり単離されるいずれのPrPB Pをも含み、または上述のマウスPrPB Pを用いて相同スクリーニングまたはPCR増幅によって単離されるいずれのPrPB Pをも含む。同様に本発明には、結合作用を破壊しないように修飾されたPrP-AP融合蛋白およびPrPB Pも含まれる（それらの結合作用は、例えば本明細書

に記載のとおりに検査される)。これらの変形は、特定の突然変異、欠失、挿入、または翻訳後修飾を含むことができ、またはその蛋白（例えばPrPBP）を更に大きな融合蛋白の一構成要素として包含することを伴うこともできる。

このように本発明は、他の実施形態においては、PrPBPポリペプチドと実質的に同一であり、適切なPrP（例えば本明細書に記載のとおりに検査されたもの）と結合するいずれの蛋白をも含む。このようなホモログ（相同体）には、以下を含む：実質的に純粋で自然に存在する他の哺乳類PrPBPおよび対立遺伝子バリエーション；自然突然変異体；誘発変異体；高緊縮条件下で、または好適さに劣るが低緊縮条件下（例えば、2X SSCで40℃にて、少なくとも40個のヌクレオチドの長さのプロブを用いた洗浄）でマウスPrPBPのDNA配列とハイブリッド形成するDNAに、コードされた蛋白；およびPrPBPに対抗する抗血清に特異的に結合される蛋白。同じホモログという用語には、PrPBP部分を含むキメラポリペプチドをも含む。

本発明はさらに、自然に存在するいずれのPrPBPポリペプチドのアナログを含む。アナログは、自然に存在するPrPBP蛋白とは、アミノ酸配列の相違、翻訳後修飾、またはその双方によって異なることが可能である。本発明によるPrPBPアナログは同様に、PrPに結合する性能を保持しなければならない。本発明のアナログは一般的に、自然に存在するPrPBPアミノ酸配列の全体または一部との、少なくとも85%、より好ましくは90%、最も好ましくは95%または99%の同一性を示す。配列比較の長さは、少なくとも15個のアミノ

酸残基であり、より好ましくは少なくとも25個のアミノ酸残基であり、さらに好ましくは少なくとも35個のアミノ酸残基である。修飾は、ポリペプチドのインビボ及びインビトロでの化学的誘導体形成をも含む。その化学的誘導体形成は、例えばアセチル化、カルボキシル化、またはグリコシル化を含む。このような修飾は、ポリペプチド合成またはプロセッシングの間に、または単離された修飾酵素を用いた処理に続いて実施され得る。アナログはまた、自然に存在するPrPBPとは、一次配列における変性によって異なることが可能である。これらの変

性には、自然の遺伝的バリエーションおよび誘発された遺伝的バリエーションの双方（例えば、放射線照射またはエタノール硫酸(ethanolmethylsulfate)の露出によるランダムな変異誘発、もしくはSambrook, Fritsch及びManiatisによるMolecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd ed.), CSH Press, 1989またはAusubel et al., supraに記載の部位特異的突然変異誘発から得られるもの）を含む。さらに変性には、例えばD-アミノ酸残基、もしくは、 β または γ アミノ酸などの自然に存在しない又は合成のアミノ酸であるL-アミノ酸以外の残基を包含する、環化されたペプチド、分子、およびアナログが含まれる。

ポリペプチド全体に加え、本発明はPrPB Pフラグメントをも含む。本明細書にて使用するとおり、「フラグメント」という用語は、少なくとも5個、好ましくは少なくとも20個、より好ましくは少なくとも30個の連続的なアミノ酸を意味し、さらに好ましくは少なくとも50個の連続的なアミノ酸、そして最も好ましくは少なくとも60個から80個もしくはそれ以上の連続的なアミノ酸を意味する。PrPB Pのフラグメントは、当業者に知られている方法によって生成され得るし、もしくは通常の蛋白プロセッシング（例えば、発生期のポリペプチドからの、生物学的作用には必要のないアミノ酸の除去、もしくは、選択的mRNAスプライシングまたは選択的蛋白プロセッシング事象によるアミノ酸の除去）から得ることができる。

本明細書に記載された全ての刊行物および特許出願を、各刊行物および特許出願に対して個別に明確に引用して援用するとの旨を記した場合と同様に、本願に引用して援用する。

他の実施形態は、請求の範囲内である。

【図1】

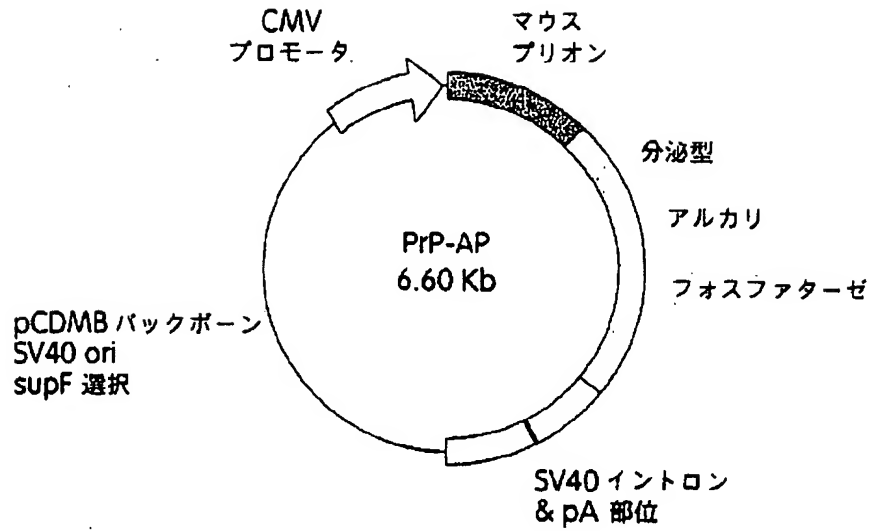


Fig. 1A

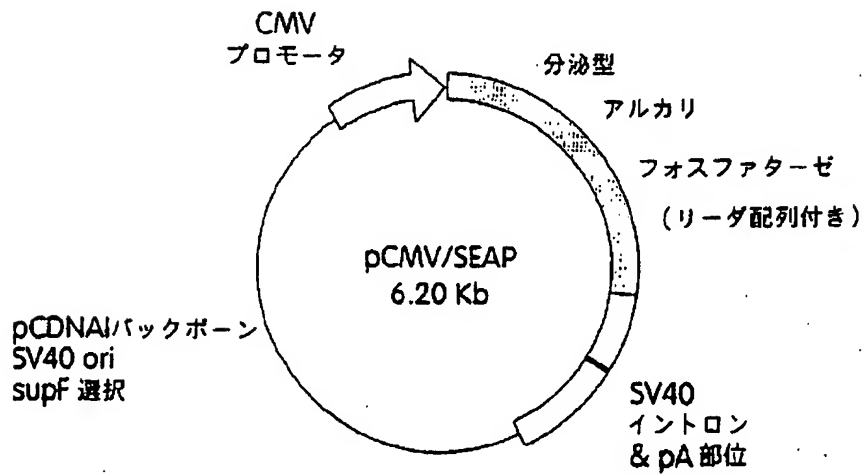


Fig. 1B

【図2】

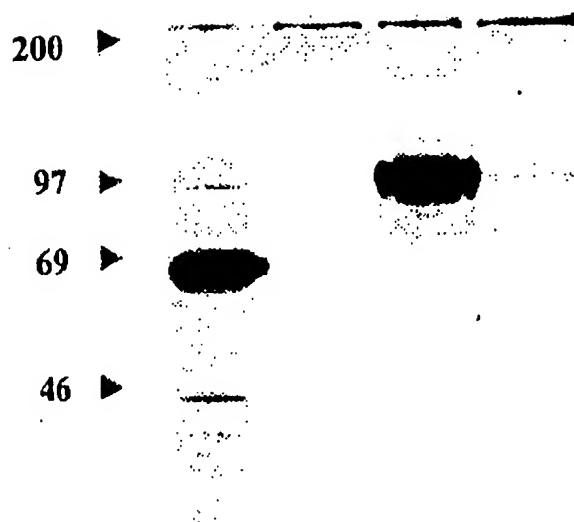


Fig. 2

【図3】

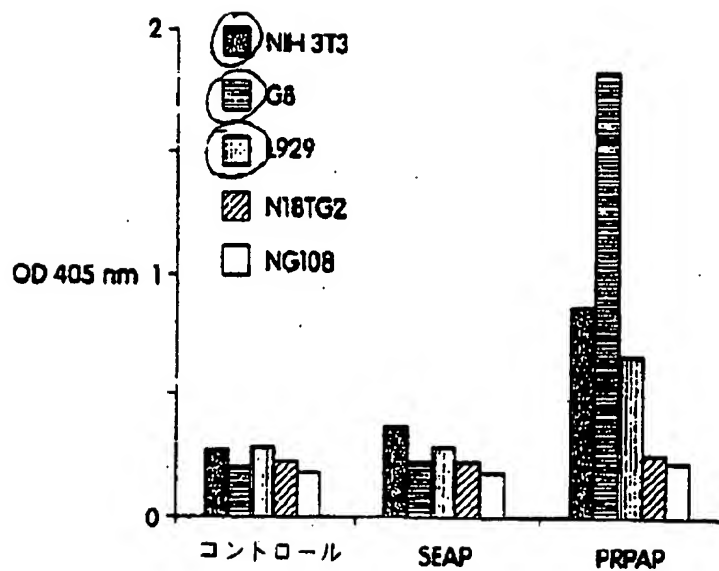


Fig. 3

【図4】

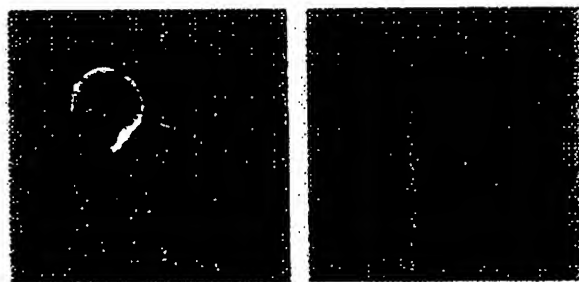


Fig. 4

【図5】

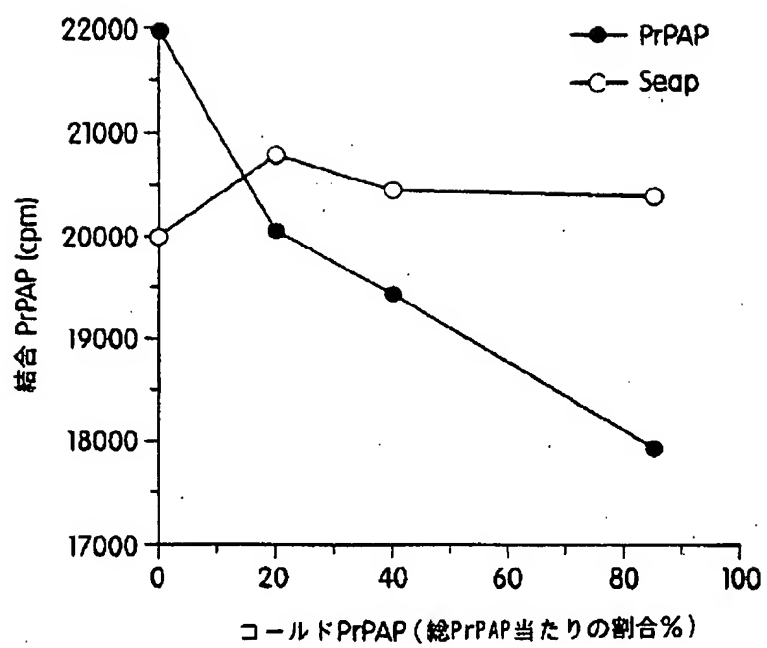


Fig. 5

【図6】



Fig. 6

1
gcttccaccatcattcactatgagatcctggaggagagagagaggggttccccgtg
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
cgaaggtggttagtaactgatactctaggacctcctctctctctcccccaaggggcac
V P K A
⤴
(A) S T I I H Y E I L E E R E R G F P V -

61
ggtaacgtggtcacggatccttggttggatctcggcagtcctgtcggcccgccggctcgg
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
ccattgcaccagtgccatagaaccaaacctagagccgtcagacagccgggcgccgagggcc
A N F P
G N V V T D L G L D L G S L S A R R L R -

121
gtggtgtccggagctagccgtaggttctttgaggtgaactgggagactggagagatgttc
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
caccacaggcctcgatcggcatccaagaaactccacttgaccctctgacctctctacaag
R
V V S G A S R R F F E V N W E T G E (M) F -

181
gtcaacgatcgactggaccgagaggagctgtgcgggacgctgccctcctgcactgtaact
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
cagttgctagctgacctggctctcctcgacacgccttgcgacgggaggacgtgacattga
V N D R L D R E E L C G T L P S C T V T -

241
ctggagttggtggttagagaacccgctggagctgttcagcgcggaagtgggtggtccaggac
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
gacctcaaccaccatctcttgggcgacctcgacaagtcgcgcccttcaccaccaggtcctg
V I
L E L V V E N P L E L F S A E V V V Q D -

Fig. 7A

atcaacgacaacaatccctcctttccccaccggggaaattggagattagcgaggcc
301 -----+-----+-----+-----+-----+
tagttgctgtttagggagaaaaggggtggcccctttactttaacctctaatacgctccgg

A Q
I N D N N P S F P T G E M K L E I S E A -

ttggcgccggggacgcgctttccgctcgagagcgcgcacgatcccgatgtggggagcaac
361 -----+-----+-----+-----+-----+
aacgcgggccctgcgcgaaaggcgagctctcgcgcggtgctagggctacaccctcggttg
V L
L A P G T R F P L E S A H D P I V G S N -

tctttacaaacctatgagctgagccacaantgagtactttgcgctccgcgtgcagactcga
421 -----+-----+-----+-----+-----+
agaaatgtttgatactcgactcggtgttactcatgaaacgcgagggcgcacgtctgagct

S L Q T Y E L S H N E Y F A L R V Q T R -

gaagacggcacgaaatatgCGGagctggtcctggagcgcgccctagattgggaacggggag
481 -----+-----+-----+-----+-----+
cttctgCCGTgctttatacgCCTcgaccaggacctcgcgcgggatctaacccttgccctc
S R
E D G T K Y A E L V L E R A L D W E R E -

cgccgtcttcag
541 -----+--
gcggcagaagtc
P S
R R L Q -

Fig. 7B

【手続補正書】

【提出日】平成10年12月4日(1998.12.4)

【補正内容】

- (1) 明細書第12頁12行、第21頁17行に記載の「図7」を『図7A及び7B』に補正する。
- (2) 明細書第13頁3行に記載の「(前進プライマー)」を『(前進プライマー)(配列番号3)』に補正する。
- (3) 明細書第13頁5行に記載の「(逆向きプライマー)」を『(逆向きプライマー)(配列番号4)』に補正する。
- (4) 明細書第27頁15行に記載の「(前進プライマ)」を『(前進プライマー)(配列番号5)』に補正する。
- (5) 明細書第27頁17行に記載の「(逆向きプライマ)」を『(逆向きプライマー)(配列番号6)』に補正する。
- (6) 明細書第38頁29行に記載の「請求の範囲内である。」の次に下記の通り配列表を追加する。

配列表

配列番号：1

配列の長さ：549

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列

```
GCTTCCACCA TCATTCACTA TGAGATCCTG GAGGAGAGAG AGAGGGGGTT CCCC GTGGGT   60
AACGTGGTCA CGGATCTTGG TTTGGATCTC GGCAGTCTGT CGGCCCGCCG GCTCCGGGTG  120
GTGTCCGGAG CTAGCCGTAG GTTCTTTGAG GTGAAGTGGG AGACTGGAGA GATGTTCGTC  180
AACGATCGAC TGGACCGAGA GGAGCTGTGC GGGACGCTGC CTCCTGCAC TGTAAGTCTG  240
GAGTTGGTGG TAGAGAACCC GCTGGAGCTG TTCAGCGCGG AAGTGGTGGT CCAGGACATC  300
AACGACAACA ATCCCTCTTT CCCACCGGG GAAATGAAAT TGGAGATTAG CGAGGCCTTG  360
GCGCCGGGGA CGCGCTTTCC GCTCGAGAGC GCGCACGATC CCGATGTGGG GAGCAACTCT  420
TTACAAACCT ATGAGCTGAG CCACAATGAG TACTTTGCGC TCCGCGTGCA GACTCGAGAA  480
GACGGCACGA AATATGCGGA GCTGGTCCTG GAGCGCGCCC TAGATTGGGA ACGGGAGCGC  540
CGTCTTCAG                                     549
```

配列番号：2

配列の長さ：183

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の特徴：タンパク質

配列

Ala Ser Thr Ile Ile Glu Tyr Glu Ile Leu Glu Glu Arg Glu Arg Gly
 1 5 10 15
 Phe Pro Val Gly Asn Val Val Thr Asp Leu Gly Leu Asp Leu Gly Ser
 20 25 30
 Leu Ser Ala Arg Arg Leu Arg Val Val Ser Gly Ala Ser Arg Arg Phe
 35 40 45
 Phe Glu Val Asn Trp Glu Thr Gly Glu Met Phe Val Asn Asp Arg Leu
 50 55 60
 Asp Arg Glu Glu Leu Cys Gly Thr Leu Pro Ser Cys Thr Val Thr Leu
 65 70 75 80
 Glu Leu Val Val Glu Asn Pro Leu Glu Leu Phe Ser Ala Glu Val Val
 85 90 95
 Val Gln Asp Ile Asn Asp Asn Asn Pro Ser Phe Pro Thr Gly Glu Met
 100 105 110
 Lys Leu Glu Ile Ser Glu Ala Leu Ala Pro Gly Thr Arg Phe Pro Leu
 115 120 125
 Glu Ser Ala His Asp Pro Ile Val Gly Ser Asn Ser Leu Gln Thr Tyr
 130 135 140
 Glu Leu Ser His Asn Glu Tyr Phe Ala Leu Arg Val Gln Thr Arg Glu
 145 150 155 160
 Asp Gly Thr Lys Tyr Ala Glu Leu Val Leu Glu Arg Ala Leu Asp Trp
 165 170 175
 Glu Arg Glu Arg Arg Leu Gln
 180

配列番号 : 3

配列の長さ : 36

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸
配列

AGACATAAGC TTGCAGCCAT CATGGCGAAC CTTGGC

36

配列番号：4
配列の長さ：31
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸
配列

GAGATTGGAT CCTCTTCTCC CGTCGTAATA G

31

配列番号：5
配列の長さ：36
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸
配列

AGACATAAGC TTGCAGCCAT CATGGCGAAC CTTGGC

36

配列番号：6
配列の長さ：30
配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸

配列

GAGATTGGAT CCTCTCTGGT AATAGGCCTG

30

(7) 図3を別紙の通り補正する。

【図3】

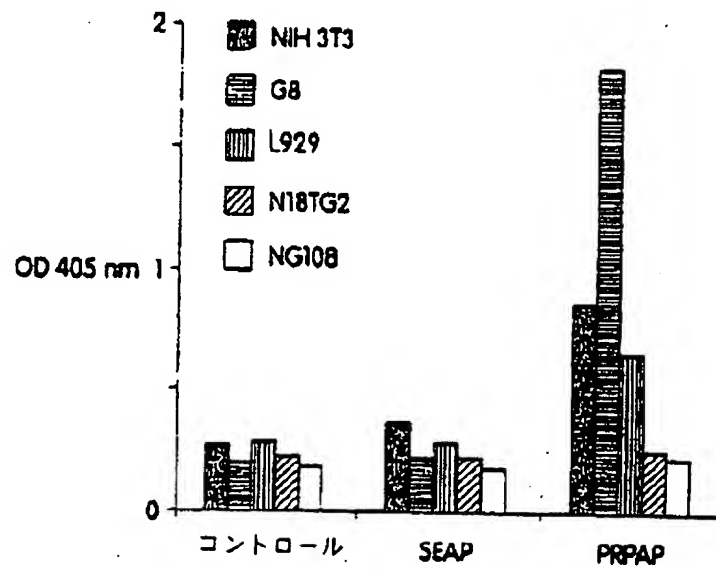


Fig. 3

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Intern. Appl. No. PCT/IB 97/00827
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C12N15/62 G01N33/68 C12Q1/68 A61K38/17		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 G01N C12Q C12N A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	PRIOLA SA ET AL: "Prion protein and the scrapie agent: in vitro studies in infected neuroblastoma cells." INFECT AGENTS DIS, APR-JUN 1994, 3 (2-3) P54-8, UNITED STATES, XP002056072 see the whole document	1
Y	OESCH, BRUNO ET AL: "Identification of cellular proteins binding to the scrapie prion protein" BIOCHEMISTRY (1990), 29(24), 5848-55 CODEN: BICHAW; ISSN: 0006-2960, XP002056073 see the whole document	1
A	--- -/--	2-19
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "A" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
19 February 1998		03.03.98
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 5818 Patentkanal 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3018		Authorized officer Gurdjian, D

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Internat. Application No.
PCT/18 97/00827

C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	FLANAGAN JG ET AL: "The kit ligand: a cell surface molecule altered in steel mutant fibroblasts." CELL, OCT 5 1990, 63 (1) P185-94, UNITED STATES, XP002056074 see the whole document ---	7
Y	WEISS S ET AL: "OVEREXPRESSION OF ACTIVE SYRIAN GOLDEN HAMSTER PRION PROTEIN PRPC AS A GLUTATHIONE S-TRANSFERASE FUSION IN HETEROLOGOUS SYSTEMS" JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 69, no. 8, August 1995, pages 4776-4783, XP000644456 see the whole document ---	7
A	TELLING G C ET AL: "PRION PROPAGATION IN MICE EXPRESSING HUMAN AND CHIMERIC PRP TRANSGENES IMPLICATES THE INTERACTION OF CELLULAR PRP WITH ANOTHER PROTEIN" CELL, vol. 83; no. 1, 6 October 1995, pages 79-90, XP000674450 see page 86, left-hand column, paragraph 2 - paragraph 3 ---	1,8
A	KURSCHNER, CORNELIA ET AL: "Analysis of interaction sites in homo- and heteromeric complexes containing Bcl-2 family members and the cellular prion protein" MOL. BRAIN RES. (1996), 37(1,2), 249-58 CODEN: MBREE4; ISSN: 0169-328X, XP002056075 see the whole document ---	1,8
A	CAUGHEY, BYRON ET AL: "Binding of the protease-sensitive form of prion protein PrP to sulfated glycosaminoglycan and Congo red" J. VIROL. (1994), 68(4), 2135-41 CODEN: JOVIAH; ISSN: 0022-538X, XP002056076 see the whole document ---	1,8
A	OESCH, BRUNO: "Characterization of PrP binding proteins" PHILOS. TRANS. R. SOC. LONDON, SER. B (1994), 343(1306), 443-5 CODEN: PTRBAE; ISSN: 0080-4622. 1994, XP002041123 see the whole document ---	1-6,8-19
	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/IB 97/00827

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 122, no. 5, 30 January 1995 Columbus, Ohio, US; abstract no. 49358. OESCH, BRUNO ET AL: "Interaction of the prion protein with cellular proteins" XP002056077 see abstract & PRION DIS. HUM. ANIM. (1992), 398-406. EDITOR(S): PRUSINER, STANLEY B. PUBLISHER: HORWOOD, LONDON, UK. CODEN: 60BWAD. ---	1-19
P,X	YEHIELY, FRUMA ET AL: "Identification of candidate proteins binding to prion protein" NEUROBIOL. DIS. (1997), 3(4), 339-355 CODEN: NUDIEH;ISSN: 0969-9961, 1997, XP002041124 see abstract see page 340, left-hand column, paragraph 3 - right-hand column, paragraph 1 see page 343, left-hand column, paragraph 3 - page 344, right-hand column, paragraph 5 see page 351, left-hand column, paragraph 2 - page 352, left-hand column, paragraph 3 see page 353, left-hand column, last paragraph ---	1,6,8
P,X	WO 97 16728 A (UNIV CALIFORNIA) 9 May 1997 see page 6, line 12 - page 7, line 6 see page 7, line 35 - page 8, line 34 see page 20, line 28 - page 21, line 18 -----	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB 97/08827

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 8.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

see additional sheet

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/18 97/00827

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

1. Claims: 1-6 8-19

Method for identifying nucleic acid encoding a prion binding protein, uses of a prion binding protein for identifying compounds for the treatment of a disorder associated with the presence of a prion protein, for removing PrPsc from a biological sample, for treating a disease associated with the presence of a prion protein, for identifying compounds for the treatment of an undesirable level of interaction between cadherin and PrPc, and for treating a disease associated with with an interaction between cadherin and PrPc.

2. Claim : 7

Fusion protein comprising PrP and all or portion of alkaline phosphatase

International Application No. PCT/IB 97/00827

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Remark : Although claims 9-12 and 14-19 are directed to a method of treatment of the human/animal body , the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

特表2000-512131

Internal Application No

PCT/IB 97/00827

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9716728 A	09-05-97	AU 7601296 A	22-05-97

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	ターマコード (参考)
A 6 1 K 38/00		C 0 7 K 14/47	
C 0 7 K 14/47		19/00	
		C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/02		G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/15		33/50	Z
		33/53	L
		33/566	
		A 6 1 K 37/02	

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.